Zur Charakterisierung eines immunsuppressiven Serumfaktors bei der akuten und chronischen Hepatitis

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Christoph Bröckl
aus Freiburg

1984

Zur Charakterisierung eines immunsuppressiven Serumfaktors bei der akuten und chronischen Hepatitis

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Christoph Bröckl
aus Freiburg

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 1984

Dekan: Prof. Dr. H.U. Seitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. P.A. Berg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Bessler

Die hier vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. P.A. Berg an der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen Abteilung II, die von Herrn Prof. Dr. H.D. Waller geleitet wird.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und wichtige Anregungen möchte ich Herrn Prof. Dr. P.A. Berg herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. N. Brattig für sein Interesse und die vielen wertvollen Ratschläge und weiterführenden Diskussionen.

Allen Mitarbeitern des Immunpathologischen Labors Prof. Dr. P.A. Berg danke ich für ihr Interesse und ihre Hilfsbereitschaft.

Frau M. Dürnay danke ich für die Durchführung der photographischen Arbeiten.

Abkürzungen

Affi Gel/Affi Gel Blue	Cibacron Blue F 36 A Affinity Gel
AVH	Akute Virushepatitis
CAH	chronisch aggressive Hepatitis
cpm	Impulse pro Minute
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
LIP	Liver Immunoregulatory Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHA	Phytohämagglutinin
SDS	Dodecylsulfat, Natriumsalz
SIF	Seruminhibitionsfaktor
SIF^+/SIF^-	SIF-positives/SIF-negatives Serum/Fraktion
s	Standardabweichung
$\bar{x}$	Mittelwert

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547617_0011

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	8
II.1.	Chemikalien	8
II.2.	Seren	9
II.3.	Biologisches Testsystem	10
II.4.	Fraktionierung der Seren	12
II.5.	Analytische Methoden	15
II.6.	Weitere Charakterisierungsversuche	17
II.7.	Vergleich der Aktivität auf verschiedenen Reinigungsstufen	18
III.	Ergebnisse	19
III.1.	Chromatographie der Seren	19
III.2.	Trennung von SIF von Albumin	28
III.3.	Charakterisierung von SIF in der Dünnschichtchromatographie	34
IV.	Diskussion	41
V.	Zusammenfassung	49
VI.	Literatur	50
VII.	Anhang	65

I. EINLEITUNG

Im Verlauf von Immunreaktionen und Entzündungsvorgängen werden von den Immunzellen und den Leberzellen eine Vielzahl von Reaktionsprodukten freigesetzt, die bei der Regulation dieser Vorgänge eine Rolle spielen. Solche, immunregulative Faktoren können in den Kulturüberständen aktivierter Lymphozyten und Monozyten nachgewiesen werden (Oppenheim, 1981; Rocklin et al., 1980; Cohen und Yoshida, 1979). Ebenso wurden immunregulative Effekte bzw. Faktoren in den Seren von Patienten mit Tumorerkrankungen (Kamo und Friedmann, 1977) und verschiedenen infektiösen oder autoimmunen Erkrankungen (Nelson und Gatti, 1976) und bei Entzündungsprozessen beobachtet.(Sipe und Rosenstreich, 1981).

Die in den Kulturüberständen Mitogen- oder Antigen-stimulierter Lymphozyten oder Makrophagen nachgewiesenen, immunregulativen Faktoren wurden hauptsächlich auf Grund ihrer biologischen Aktivität in verschiedenen Testsystemen definiert. Diese als Lymphokine oder auch Cytokine bezeichneten Faktoren bewirken sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte, indem sie die Beweglichkeit oder die Differenzierung bzw. Proliferation von Immunzellen beeinflussen (Tab. 1).
Auf Grund der geringen Mengen, in denen die Lymphokine in den Kulturüberständen gefunden wurden, gelang die biochemische und biologische Charakterisierung und eine eindeutige Unterscheidung bisher nur für einige Faktoren, wie z.B. Macrophage Migration Inhibitory Factor, T-Helper Cell Replacing Factor, Colony Stimulating Factor (Kniep et al., 1981; Hübner et al., 1980), Interleukin-1 (Togawa et al., 1982), Interleukin-2 (Gillis et al., 1982, Farrar et al., 1982) und Interferon (Toy, 1983; Epstein et al., 1981). Daher besteht noch Unklarheit darüber wieviele Cytokine es wirklich gibt. Denn einerseits läßt sich nicht ausschließen, daß sich manche Faktoren auf die Wirkung ein und desselben

Tabelle 1: Immunregulative Faktoren, die von Zellen des Immunsystems gebildet werden

Faktor	Produktionszelle	Biologische Aktivität	Referenz
Interleukin-1/ Leucocyte Activating Factor (LAF)	Makrophage	aktiviert T_H-Lymphozyten + SAA-Inducer, Endogenes Pyrogen	Kierszenbaum + Waksman (1977), Mizel et al. (1978), Economou + Shin (1978), Mizel (1979)
Interleukin-2	T_H-Lymphozyt	stimuliert Ak-Produktion, aktiviert cytotox. Zellen	Gillis et al. (1978), Watson et al. (1978), Farrar et al. (1980)
T Cell-Replacing Factor (TRF)	T_H-Lymphozyt	bewirkt AK-Produktion	Schimpl + Wecker (1972), Hübner et al. (1978), Watson et al. (1978)
Colony Stimulating Factor (CSF)	T_H-Lymphozyt	stimuliert Makrophagen-wachstum u. -replikation	Stanley et al. (1976), Moore et al. (1980)
Macrophage Activating Factor (MAF)	T_H-Lymphozyt	induziert bakteriozide u. tumorizide Makrophagen-aktivität	Evans et al. (1972), Leonhard et al. (1978), Kniep et al. (1981)
Soluble Immune Suppressive Substance	Suppressor Zelle	aktiviert Makrophagen die AK-Produktion der B-Zelle zu inhibieren	Pierce et al. (1976), Tadakuma et al. (1978), Aune + Pierce (1981)
Inhibitor of DNA-Synthesis (IDS)	Suppressor Zelle	stoppt B-Zelle in später G_1-Phase durch Binden an DNA-Polymerase	Badger et al. (1973), Namba + Waksman (1975), Gonzales + Verly (1978), Lee + Lucas (1978)
Leucocyte Inhibiting Factor (LIF)	T-Lymphozyt	inhibiert Mobilität neutrophiler Leukozyten	Rocklin (1975), Chapman + Kirkpatrick (1978), Roberts + Sandberg (1979)
Macrophage Migration Inhibiting Factor (MIF)	T-Lymphozyt	inhibiert Mobilität von Makrophagen	Bloom + Bennet (1966), David (1966), Hübner et al. (1980)

Moleküls zurückführen lassen, andererseits gibt es Hinweise, daß ein beobachteter, immunregulativer Effekt sich auf das Zusammenwirken verschiedenen Zellen und Faktoren zurückführen läßt (Oppenheim, 1981).

Immunregulative bzw. immunsuppressive Faktoren werden während des Ablaufs eines Immun- oder Entzündungsprozesses nicht nur von den Immunzellen sondern auch von den Leberzellen gebildet (Levy und Chisari, 1981; Sipe und Rosenstreich, 1981).
Während der ersten Tage eines Entzündungsvorganges kann man eine Erhöhung in der Konzentration bestimmter Plasmaproteine beobachten; diese Proteine werden im allgemeinen als Akutphaseproteine bezeichnet. Diese Konzentrationsveränderungen im Plasma können in eine frühe (1 bis 4 Std.) und eine späte (18 bis 72 Std.) Phase unterteilt werden (Gordon, 1976; Kushner, 1980).
Die frühen Akutphaseproteine, wie Endogenes Pyrogen (Dinarello, 1979) und Serum Amyloid A-Inducer (Sipe et al., 1979) sind Makrophagenprodukte und dienen der Stimulation des Enzündungsprozesses und der Induktion weiterer Faktoren.
Die Konzentrationserhöhung der späten Akutphaseproteine im Serum ist dagegen auf eine erhöhte Syntheseleistung der Leberzellen zurückzuführen (Koj, 1974). Sie dienen zur Regelung eines kontrollierten Verlaufs und Beendigung des Entzündunsvorganges (Sipe und Rosenstreich, 1981).
So konnten für einige dieser Akutphaseproteine, wie C-reaktives Protein (Mortensen, 1979), $alpha_1$-Antitrypsin (Arora und Miller, 1978), $alpha_1$-saures Glycoprotein (Bata et al., 1980) $alpha_2$-Makroglobulin (Hubbard, 1978) und Serum Amyloid A (Benson und Aldo-Benson, 1977) immunsuppressive Eigenschaften nachgewiesen werden.
Außerdem werden in der Leber einige Lipoproteine synthetisiert, von denen gezeigt werden konnte, daß sie immunsuppressive Eigenschaften besitzen (Curtiss und Edgington, 1976, Morse et al., 1977). Im Verlauf einer Immunreaktion können auch abnorme Low Density Lipoproteine entstehen, die ebenfalls immunsuppressiv wirken (Chisari, 1982; Chisari und Edgington, 1975).

Ein weiteres inhibitorisches Protein konnte direkt aus den Extrakten der perfundierten Leber sowohl des Menschen (Chisari, 1978; Grol und Schumacher, 1983, Schrempf-Decker et al., 1983) als auch der Ratte (Pizzo et al., 1982) isoliert werden. Im Serum konnte dieser Faktor noch nicht nachgewiesen werden (Chisari, 1982).

Auch durch die Seren von Patienten mit verschiedenen Infektionen, Autoimmun- oder Tumorerkrankungen kann die Mitogen- oder Antigen-induzierte Proliferation von Patienten- und Kontrollymphozyten suppremiert werde. (Nelson und Gatti, 1976).
So wurden solche Faktoren bei Lepra (Bjune und Barnetson, 1976; Nelson et al., 1975), Tuberculose (Ellner, 1978), Schistosomiasis (Ottensen et al., 1978), Nephrotisches Syndrom (Martini et al., 1981), Myocarditis (Maisch et al., 1980), Morbus Hodgkin (Moghe et al., 1980), Melanom (Murray et al., 1978) und Lungencarcinom (Izumi et al., 1980) beschrieben. Allerdings wurde in den seltensten Fällen versucht den verantwortlichen Faktor zu isolieren und näher zu charakterisieren.
Auch in der Ascitisflüssigkeit von Patienten mit verschiedenen Carcinomen konnten immunsuppressive Faktoren nachgewiesen werden (Ting et al., 1977; Badger et al., 1978, Hess et al., 1979).

Auch in den Seren von Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis sind suppressive Effekte beschrieben worden. So stellten in Übereinstimmung mit Mella und Lang (1967) Willems et al. (1969) fest, daß der ^{3}H-Thymidineinbau in Mitogen-stimulierte Lymphozyten durch Seren aus der frühen Phase der epidemischen Hepatitis und der Serumhepatitis reduziert wurde. Suppressive Effekte auf die Lymphozyten gesunder Spender durch Seren von Patienten im frühen Stadium der epidemischen Hepatitis beschrieben auch Pappas et. al. (1970), Baroyen et al. (1970) und Newble et al. (1975).
Newberry et al. (1973), Nakao et al. (1975), Geubel et al. (1976) und Tremolada et al. (1977) konnten zeigen, daß auch Seren von

Patienten mit chronischen Lebererkrankungen die Mitogen-stimulierte Proliferation normaler, homologer Lymphozyten unterdrückten.
Brattig fand 1978, daß die Seren von Patienten mit sowohl akuter als auch chronisch aggressiver Hepatitis einen suppressiven Effekt auf die PHA-stimmulierte Proliferation autologer, homologer und heterologer Lymphozyten bewirkte.

Bei der chromatographischen Auftrennung solcher Seren fand man häufig, daß alpha-Globuline, zu deren Klasse einige Akutphaseproteine zählen, eine Rolle spielen.
Schon Kamrin (1959) und Mowbray (1963) beschrieben den immunsuppressiven Effekt einer mit alpha-Globulinen angereicherten Serumfraktion (Cohn Fraction IV; Cohn et al., 1946) im Rahmen von Transplantationsversuchen.
Cooperband et al. (1969, 1972) fanden eine die Lymphozytenstimulation inhiebirende, immunregulative alpha-Globulinfraktion (IRA) im Normalserum. Auch Nelken (1973) und Hanna et al. (1975) konnten ein mit alpha-Globulinen assoziiertes, immunsuppressives Protein (NIP) in Normalseren nachweisen. Voorting-Hawking und Michael (1977) konnten eine Unterdrückung der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation durch eine Serumfraktion, die hauptsächlich Albumin und alpha-Globuline enthielt, nachweisen.

Glasgow et al. (1974) und Nimberg et al. (1975) beschrieben die Assoziation immunsuppressiver Effekte mit alpha-Globulinen in den Seren von Krebspatienten. Auch bei Patientinnen mit Ovarcarcinomen konnte gezeigt werden, daß die daraus isolierte, immunsuppressive Fraktion alpha-Globuline enthielt (Hess et al., 1980).
Glasgow et al. (1974) und Nimberg et al. (1975) konnten von den aus Seren von Krebspatienten isolierten, immunsuppressiven alpha-Globulinen eine inhibierende Peptidfraktion abspalten. Ähnliche Ergebnisse erhielten Occhino et al. (1973) und Garner et al. (1980) bei Normalseren.
Girman et al. (1976) und Plow et al. (1982) fanden eine Inhibition der Proteinsynthese von Lymphozyten durch Fibrinogenabbauprodukte.

Wolf und Andreoni konnten 1982 im Normalserum ein an ein Glycoprotein gebundenes, immunsuppressives Lipid nachweisen, das Wolf und Merler 1979 aus den Kulturüberständen aktivierter Lymphozyten isoliert hatten.
Als Mediatoren der Immunsuppression bei Entzündungen und allergischen Prozessen werden auch Prostaglandine diskutiert (Metcalfe und Kaliner, 1981; Robinson, 1981). Bockman (1980) beobachtete eine erhöhte Prostaglandinsynthese durch Makrophagen von Patienten mit Morbus Hodgkin.

Bei Hepatiden wurde verschiedentlich eine inhibierende Wirkung durch $alpha_1$-Fetoprotein oder ein an $alpha_1$-Fetoprotein gebundenes, niedermolekulares Effektormolekül diskutiert (Tomasi, 1977, 1978). Silver et al. konnten 1974 eine starke Erhöhung der $alpha_1$-Fetoprotein-Konzentration im Serum von Patienten mit chronischer Hepatitis nachweisen.
Bei der Virushepatitis konnten Chisari et al. (1975) ein Lipoprotein nachweisen, das die Rosettenbildung von Schafserythrozyten inhibiert; es handelt sich hierbei um ein abnormes Very Low Density Lipoprotein, das bei der Schädigung von Leberzellen nachweisbar ist (Levy und Chisari, 1981).
Nakao et al. (1975) konnten in den Seren von Patienten mit verschiedenen akuten und chronischen Lebererkrankungen einen Faktor nachweisen, der die Proliferation Mitogen-stimulierter Lymphozyten hemmt. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Inhibitionsfaktor mit Albumin und alpha- und beta-Globulinen assoziiert ist (Nakao et al., 1978).

Der von Brattig 1978 beschriebene Seruminhibitionsfaktor (SIF) in Seren von Patienten mit akuter und chronisch aggressiver Hepatitis war in erster Linie auf seine immunbiologischen Wirkungen untersucht worden. So konnte gezeigt werden, daß SIF nicht zytotoxisch und die Hemmung reversibel ist. SIF hemmt die Mitogen-induzierte Proliferation autologer, homologer und heterologer Lymphozyten bei verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlicher Kulturdauer. Kinetische Untersuchungen ergaben, daß SIF-positive

Seren zwölf bis achtzehn Stunden nach der Lymphozytenaktivierung einwirken müssen, um eine optimale Hemmung der Lymphozytenproliferation zu erzielen. Durch Molekularfiltration konnte für SIF ein Molekulargewicht zwischen 50000 d und 120000 d geschätzt werden.
Außerdem konnte in klinischen Studien eine gute Übereinstimmung zwischen SIF-Aktivität im Serum und Krankheitsverlauf gezeigt werden. So war bei normal verlaufenden Hepatiden SIF in den meisten Fällen vier bis sechs Wochen nach akutem Beginn nicht mehr nachweisbar. Dagegen persistierte SIF bei protrahiertem Verlauf häufig und konnte bei Patienten, die eine chronisch aggressive Hepatitis entwickelten, noch zwei Jahre nach akutem Krankheitsbeginn nachgewiesen werden (Brattig et al., 1984)

In der hier vorliegenden Arbeit sollte SIF durch biochemische Reinigungsverfahren näher bestimmt und mit anderen immunsuppressiven Serumfaktoren verglichen werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Chemikalien für die Lymphozytenkultur

Heparin-Na 25000 IE (Organon Teknica, Oberschleißheim), Lymphoprep^{R} (Neygard, Oslo, Norwegen), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) Ca^{2+}-, Mg^{2+}-free (Gibco Labs., München), Phosphate Buffered Saline (PBS) (Seromed, München), RPMI 1640 mit L-Glutamin (Gibco Labs., München), Gentamicin, Glutamin (Flow Labs., München) Phytohemagglutinin (Difco Labs., Detroit, Michigan, USA), Acridinorange (Merck AG, Darmstadt)

Radiochemikalien

(6-^{3}H)-Thymidin, spez. Aktivität 2 Ci/mM, Amersham-Buchler, Braunschweig

Gelmaterialien

Sephadex G-150, Sephadex G-100, Sephadex G-75, Sephadex G-10, DEAE-Sephacel (preswollen) (Pharmacia, Uppsala, Schweden), Cibacron Blue F 36 A Affinity Gel (Affi Gel Blue) (Bio-Rad Labs., München), Kieselgel 60 (Korngröße 0,063 mm - 0,2 mm) (Merck AG, Darmstadt)

Chemikalien für die SDS-Gelelektrophorese

N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED), Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, Natriumdodecylsulfat (SDS), Mercaptoäthanol, Coomassie Brilliant Blue G-250, Bromphenolblau, Stains all (Serva, Heidelberg), Ammoniumpersulfat, Glycerin (Merck AG, Darmstadt), Molekulargewichtsmarker: Phosphorylase B, Albumin, Ovalbumin, Carboanhydrase, Trypsininhibitor, Lactalbumin (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Materialien für die Immunelektrophorese

Immunelektrophorese Kit (Hyland, München), Anti-Humanserum, Anti-Humanimmunglobuline, Anti-Humanalbumin (Daco, Boehringer Ingelheim)

Materialien für die Dünnschichtchromatographie

HPTLC Fertigplatten KG 60 F 254, Präparative Dünnschichtchromatographieplatten KG 60 (Merck AG, Darmstadt), Prostaglandin B_2, Bile Acids B 8256 (Sigma, München)
Die Nachweisreagenzien (siehe II.5.E.) wurden mit analysereinen Chemikalien der Merck AG, Darmstadt angesetzt.

Sonstige Materialien

LC-Partigenplatten mit zugehörigen Standards (Behringwerke, Marburg), $alpha_1$-Antitrypsin, $alpha_1$-saures-Glycoprotein, $alpha_2$-Makroglobulin, Transferrin, Immunglobulin G, Immunglobulin M, Immunglobulin A (Sigma, München), Proteinase K Enzygel (Boehringer Ingelheim), Humanalbumin (Paestel, Frankfurt) Ultrafiltrationskammern und Ultrafiltrationsmembranen (Amicon, Witten und Berghof, Reutlingen), Kollodiumhülsen (Sartorius, Göttingen), Visking Dialysierschläuche (Serva, Heidelberg), Millipore Filter, 0,45 µm,(Millipore Corp., Frankfurt), Mikrotiterplatten, System Cooke (Greiner, Karlsruhe), Skatron Filtermats, Zellkultursammler Skatron (Skatron, Lierbyen, Norwegen), Hamiltonspritze (Fischer, Frankfurt), Liqifluor^R (New England Nuclear, Boston, USA), Flüssigkeitsszintillationszähler Isocap 300 (Searle Nuclear, Chicago, USA)

2. Seren

Es wurden Seren und Serumpools von Patienten mit akuter Virus Hepatitis oder mit histologisch gesicherter, chronisch aggressiver Hepatitis mit einer Ausgangsaktivität >75 % und Seren oder Serumpools von Normalpersonen untersucht.

3. Biologisches Testsystem

A. Präparation der Lymphozyten

Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte im wesentlichen nach der von Böyum 1968 beschriebenen Methode. 35 ml venöses Spenderblut, gemischt mit Heparin (Liquemin 25 IE/ml) wurden auf 15 ml Ficoll-Ispaquelösung der Dichte 1,007 g/ml aufgetragen und 30 Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Danach wurde das Plasma abpipettiert und durch Erhitzen auf 56° C dekomplementiert.
Die in der Interphase angereicherten Lymphozyten wurden durch dreimaliges Resuspendieren in Ca^{2+}- und Mg^{2+}-freiem HBSS und jeweiligem Zentrifugieren bei 500 x g gewaschen und anschließend in RPMI mit 100 µg/ml Gentamicin und 2 x 10^{-3} Glutamin aufgenommen.
Jetzt wurde eine Probe entnommen und nach einer Vitalfärbung mit Acridinorange wurde die Lymphozytenzahl in der Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellsuspension mit RPMI auf eine Dichte von 4 Millionen Zellen/ml eingestellt.

B. Lymphozytenkultur

Die Lymphozytenkulturen wurden nach der von Oppenheim und Rosenstreich (1976) und Yamamura (1973) beschriebenen Methode durchgeführt.

Lymphozytenkultur für Seren

Die Kulturen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt.
1 x 10^5 Zellen wurden in 200 µl Medium mit 20 % Test- oder Kontrollserum mit 2 µl PHA bei 37° C in einer mit 5 % CO_2 angereicherten feuchten Atmosphäre 48 bis 72 Stunden inkubiert.
6 bis 8 Stunden vor Beendigung der Inkubation erfolgte die Markierung mit 0,22 µCi (6-^{3}H)-Thymidin der spezifischen Aktivität 2 Ci/mM (1 µCi/ml Kulturflüssigkeit).
Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines multiplen Zellkultur-

sammlers auf Glasfiberfilter abgesaugt, gewaschen und in Polyäthylen fläschchen getrocknet.
Die Messung der Radioaktivität auf den Filtern erfolgte in 2 ml Szintillationsflüssigkeit (43 ml Liquifluor in 1 l Toluol) in einem Isocap 300 Szintillationszähler. Die Impulse pro Minute (cpm) der einzelnen Kulturansätze wurden als Äquivalent für den Einbau von radioaktivem Thymidin in die transformierten Lymphozyten gewertet.

Lymphozytenkultur für die Serumfraktionen
1×10^5 Zellen in 100 µl Medium mit 30 % Normalserum wurden mit 20 µg oder 40 µg Protein entsprechender Serumfraktionen in 100 µl PBS unter den gleichen Bedingungen wie bei den Kulturen für die Seren inkubiert. Bei zu geringen Proteinkonzentrationen wurden 100 µl Fraktion pipettiert. Den Kontrollkulturen wurden 100 µl PBS zupipettiert.

Röhrchenkulturen

Nach Präparationen mit Chloroform/Methanol wurden die Kulturen zum Teil direkt in den Glasröhrchen durchgeführt, in denen das Lösungsmittel abgedampft worden war. Dabei mußte bei gleichen Konzentrationen das Kulturvolumen verdoppelt werden.

Bestimmung der SIF-Aktivität

Die Stimulierung der Lymphozyten von Normalpersonen nach Zugabe von von Patientenseren bzw. Fraktionen, die durch Chromatographie von Patientenseren (SIF-positiv) oder Normalseren (SIF-negativ) gewonnen wurden, wurde mit der Stimulierung nach Zugabe von Normalseren oder PBS verglichen. Dabei wurden jeweils Dreifachwerte und neun Kontrollwerte bestimmt. Als Kontrollseren wurden Serumpools von drei verschiedenen Spendern verwendet.

Die SIF-Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{SIF-Aktivität} = \frac{\text{cpm nach Lymphozytenstimulation in Gegenwart von Patientenserum/Fraktion}}{\text{cpm nach Lymphozytenproliferation in Gegenwart von Normalserum/PBS}} \times 100\ \%$$

Die Kulturen wurden nur ausgewertet, wenn die Kontrollwerte größer gleich 15000 cpm waren. Eine Inhibition der Lymphozytenproliferation durch die Testseren bzw. Testfraktionen um mehr als 30 % wurde als SIF-positiv gewertet.

4. Fraktionierung der Seren

A. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel

Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel wurde mit einem NaCl-Stufengradienten (65 mM, 125 mM, 175 mM, 200 mM, 250 mM, 500 mM) in 10 mM Phosphatpuffer bei pH 8 und mit einem Na-Acetat-Stufengradienten (30 mM, 70 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM) bei pH 5 durchgeführt. 5 ml Serum oder 2 ml SIF-positive Fraktion (Gelfiltration) wurden auf eine Säule (1,6 x 20 cm) von DEAE-Sephacel aufgetragen, die mit einem der beiden Puffersysteme äquilibriert war, und mit dem entsprechenden Gradienten eluiert.

B. Gelfiltration

Gelfiltration an Sephadex G-150

7 ml Serum wurden auf Säulen (5,5 x 100 cm) von Sephadex G-150, die mit PBS äquilibriert waren, aufgetragen und mit einer konstanten Geschwindigkeit von 20 ml/Std. mit PBS eluiert.

Gelfiltration an Sephadex G-100

Die nach Chromatographie an DEAE-Sephacel erhaltenen SIF-positiven Fraktionen wurden auf ihr Ausgangsvolumen konzentriert und zur weiteren Reinigung auf Säulen (1,6 x 100 cm) von Sepha-

dex G-100 aufgetragen, die mit PBS äquilibriert waren. Die Elution erfolgte mit einer Flußrate von 10 ml/Std..

Gelfiltration an Sephadex G-75

2 ml SIF-aktive Fraktion (G-150, Affi Gel) wurden auf Säulen (1,6 x 20 cm) von Sephadex G-75 aufgetragen und mit 5 M NaCl eluiert.

C. Affinitätschromatographie

SIF-positive und SIF-negative Seren oder SIF-positive Serumfraktionen wurden mit Cibacron Blue Affinity Gel (Affi Gel Blue) bei 4° C unter leichtem Schütteln in PBS 30 Minuten inkubiert. Dabei wurde "Affi Gel Blue", entsprechend seiner Kapazität Albumin zu binden, im Verhältnis 2:1 (4-6 ml Gel/1 ml Serum + 1ml PBS) eingesetzt (Burgett und Greenley, 1977).
Danach wurde das Gel mit dem Überstand in Säulen (1,6 x 20 cm) gefüllt und mit dem dreissigfachen Volumen PBS eluiert. Das an das Gel adsorbierte Protein (Albumin) wurde 30 Minuten bei 25 ° C unter leichtem Schütteln mit 2 M NaCl inkubiert und anschließend eluiert.

Bei sämtlichen Fraktionen, die nicht mit PBS eluiert wurden, wurde durch Dialyse oder Chromatographie an Sephadex G-10 ein Pufferaustausch gegen PBS durchgeführt. Alle Fraktionen wurden durch Ultrafiltration über Berghof BM-100 bzw. Amicon Pm-10 Membranen oder in Kollodiumhülsen auf das Ausgangsvolumen reduziert sterilfiltriert und getestet oder bei -20° C aufbewahrt.

D. Molekularfiltration

SIF-positive NaCl-Eluate von "Affi Gel Blue" wurden mit 5 M NaCl im Verhältnis 1:10 dreissig Minuten unter leichtem Rühren inkubiert und anschließend über BM-100 und PM-10 Membranen (Trenngrenze 10000 d) filtriert. Das Filtrat wurde anschließend

über BM-5 und UM-05 Membranen ein weiteres Mal filtriert. Beide Fraktionen wurden danach durch Chromatographie an Sephadex G-10 entsalzt, auf ihr Ausgangsvolumen konzentriert, sterilfiltriert und getestet.

E. Extraktion mit Chloroform/Methanol

SIF-positive Eluate von "Affi Gel Blue" und Filtrate (< 10000 d) wurden mit den gleichen Volumina Chloroform/Methanol (1/1) auf dem Vortex gut durchmischt und anschließend bei 25° C unter leichtem Rühren weiter inkubiert. Danach wurde das Gemisch bei 2500 x g zentrifugiert. Die beiden Phasen wurden getrennt und im N_2-Strom oder am Rotationsverdampfer getrocknet. Die getrockneten Rückstände wurden in PBS aufgenommen in Mikrotiterplatten überführt und getestet.
Außerdem wurden aliquote Volumina beider Phasen in Glasröhrchen überführt, die Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt und die Lymphozytenkultur direkt in diesen Glasröhrchen durchgeführt.

F. Präparative Dünschichtchromatographie

1 ml SIF-positives Filtrat (< 10000 d) wurde auf eine präparative Dünnschichtchromatographie Platte KG 60 aufgetragen; als Fließmittel wurde ein Gemisch von Chloroform/Methanol/Wasser (62/38/8) verwendet. Danach wurde bei den auf einer analytischen Dünnschichtchromatographie Platte ermittelten RF-Werten und an der Auftragsstelle das Kieselgel abgekratzt, das Fließmittel abgedampft und das Kieselgel in 50 ml Erlenmeyerkolben überführt. Das Kieselgel wurde auf dem Vortex gut mit PBS durchmischt und nachdem es sich abgesetzt hatte, wurde der Überstand vorsichtig abpipetiert, bei 10000 x g zentrifugiert, auf das Ausgangsvolumen eingeengt, sterilfiltriert und getestet. Als Kontrolle wurde vor der Lösungsmittelfront eine aliquote Menge Kieselgel entnommen, identisch behandelt und ebenfalls in der Lymphozytenkultur getestet.

G. Chromatographie an Kieselgel 60

1 ml SIF-positives Filtrat (< 10000 d) wurde auf eine Säule (1 x 5 cm) von Kieselgel 60 (Korngröße 0,063-0,2 mm) aufgetragen und mit Chloroform/Methanol/Wasser (62/38/8) eluiert.
Die Säule wurde mit 50 ml Fließmittel vorgewaschen, danach wurde die Probe aufgetragen und mit weiteren 50 ml eluiert. Anschließend wurde durch Náchwaschen mit weiteren 50 ml Elutionsmittel eine dritte Fraktion gewonnen. Die drei erhaltenen Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingengt, sterilfiltriert und in der Lymphozytenkultur getestet.

H. Kontrollen

Affinitätschromatographie, Molekularfiltration und Chloroform/Methanol-Extraktion wurden auch mit Lösungen von Albumin und einem Gemisch von verschiedenen Serumproteinen (Albumin, $alpha_1$-Antitrypsin, $alpha_1$-saures-Glycoprotein, $alpha_2$-Makroglobulin, Transferrin, Immunglobuline) in serumentsprechenden Konzentrationen und mit PBS durchgeführt.und die dabei erhaltenen Fraktionen getestet.

5. Analytische Methoden

A. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) mit Rinderserumalbumin als Standard.

B. Immunelektrophorese

10 µl Serumfraktion wurden immunelektrophoretisch mit Immunelektrophorese Kits von Hyland aufgetrennt. Zur Identifikation der in den Fraktionen enthaltenen Serumproteine wurden Antiseren gegen Vollserum, Immunglobuline, Albumin und ein Vergleichsserum verwendet.

C. Radiale Immundiffussion

Zur Bestimmung einiger als immunsuppressiv bekannter Serumproteine in den einzelnen Fraktionen und zur quantitativen Bestimmung von Albumin wurden LC-Partigen Platten mit den entsprechenden Standardseren benutzt.

D. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

SDS Polyacrylamid Gelelektrophoresen wurden mit einem 3 %igen Sammelgel und einem 10 %igen Trenngel nach der Methode von Lämmli (1970) durchgeführt. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue G-250 nach Fairbanks et al. (1971), Stains all, Amido Schwarz und Toluidin Blau.
Eichproteine: Phosphorylase B (94000), Albumin (67000), Ovalbumin (43000), Carboanhydrase (30000), Trypsininhibitor (20100), Lactalbumin (14400)

E. Analytische Dünschichtchromatographie

10 µl SIF-positives Filtrat (>10000 d) oder Gallensäurengemisch, oder Prostaglandin B_2 wurden auf HPTLC Fertigplatten aufgetragen und mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser (62/38/8) chromatographiert. Danach wurden die Platten unter UV-Licht (254 betrachtet und mit verschiedenen Nachweisreagenzien besprüht.
a) Anilinphtalat, b) Anisaldehyd-Schwefelsäure, c) Ammoniummolybdat-Perchlorsäure, d) Antiomon (III)-chlorid (Carr-Price-Reagenz), e) 2,6-Dichlorphenol-indophenol-Natrium, f) 2,4-Dinitrophenylhydrazin (Bygdeman und Samuelsson, 1966), g) Joddampf, h) Alkalische Permanganat-Lösung, i) Ninhydrin, j) Schwefelsäure (50 %), k) Vanillin-Schwefelsäure

Das Ansetzen der Sprühreagenzien (außer für f) und die anschliessende Behandlung der Platten erfolgte nach Stahl (1967).

Außerdem wurden Dünnschichtchromatographien auf HPTLC-Platten mit Silbernitrat durchgeführt. Dazu wurden HPTLC-Platten mit 15 %iger Silbernitratlösung besprüht bis sie gleichmäßig feucht waren und anschließend 30 Minuten bei 110° C getrocknet. Auf diese Platten wurden 10 µl Filtrat und 10 µl Prostaglandin B_2 (1 mg/ml) aufgetragen und mit einem Fließmittel aus Äthylacetat/Essigsäure/2,2,4-Trimethylpentan/Methanol/Wasser (110/30/10/35/100) (Green und Samuelsson, 1964) chromatographiert. Zum Nachweis der Substanzen wurde 50 %ige Schwefelsäure verwendet.

6. Weitere Versuche zur Charakterisierung

A. Inkubation mit Proteinase K

Aktive Eluate und Filtrate wurden mit gelgebundener Proteinase K in PBS bei 37° C inkubiert. Das Gel wurde eine halbe Stunde vorgequollen. Bei den Eluaten wurde die Enzymmenge auf das eingesetzte Albumin berechnet. Nach Beendigung der Inkubation wurde das Gel bei 10000 x g abzentrifugiert, der Überstand sterilfiltriert und getestet. Als Kontrolle wurde ein die Lymphozytenproliferation hemmendes Protein aus der Leber ebenfalls unter den gleichen Bedingungen ebenfalls mit Proteinase K inkubiert und anschließend in der Lymphozytenkultur getestet.
LIP wurde von Frau Schrempf-Decker zur Verfügung gestellt.

B. Säurestabilität von SIF

SIF-positive Eluate und Filtrate wurden unter Rühren mit 50 % Essigsäure versetzt und auf bestimmte pH Werte (6, 4, 3, 2) eingestellt und nachdem die entsprechenden pH Werte erreicht waren 15 Minuten weiterinkubiert. Danach wurde das Präzipitat bei 50000 x g abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und durch Chromatographie an Sephadex G-10 ein Pufferaustausch gegen PBS durchgeführt, Anschließend wurde der Überstand konzentriert, sterilfiltriert und getestet.

C. Hitzestabilität von SIF

SIFpositive Seren und Serumfraktionen wurden 5, 10, 15 und 30 Minuten auf 56° C, 70° C und 95° C erhitzt, anschließend 30 Minuten bei 50000 x g zentrifugiert, der Überstand sterilfiltriert und anschließend getestet.

7. Vergleich der Aktivität auf verschiedenen Reinigungsstufen

SIF-positive Seren, Eluate und Filtrate (< 10000 d) mit einer Ausgangsaktivität > 85 % wurden mit PBS 1:2, 1:4, 1:10, 1:20, 1:40 verdünnt und die Verdünnungsreihen in der Lymphozytenkultur getestet.

III. E R G E B N I S S E

1. Chromatographie der Seren

Seren und Serumpools von Patienten mit der Diagnose akute Virushepatitis oder chronisch aggressive Hepatitis (SIF-positiv), die die Proliferation von T-Zellen um mehr als 75 % hemmten, und Normalseren (SIF-negativ) wurden mit verschiedenen chromatographischen Methoden aufgetrennt und die erhaltenen Serumfraktionen auf ihre SIF-Aktivität getestet.

A. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel

Ionenaustauschchromatographie SIF-positiver und SIF-negativer Seren an DEAE-Sephacel wurden mit einem NaCl-Stufengradienten in 10 mM Phosphatpuffer bei pH 8 und mit einem Na-Acetat-Stufengradienten bei pH 5 durchgeführt.
Bei der Ionenaustauschchromatographie SIF-positiver Seren bei pH 8 eluierte SIF in drei Fraktionen (175 mM, 200 mM, 250 mM NaCl) gemeinsam mit Albumin und alpha-und beta-Globulinen. Die stärkste Inhibition wurde durch Fraktion III (175 mM NaCl) bewirkt. In dieser Fraktion, die auch bei der Chromatographie SIF-negativer Seren eine eindeutige Inhibition im Testsystem bewirkte, eluierte auch der Hauptanteil des Albumins, während die alpha-Globuline hauptsächlich in Fraktion IV eluierten (Abb. 1). Die Fraktionen I und II, in denen die Immunglobuline nachgewiesen wurden, zeigten keine SIF-Aktivität.
Auch bei der Ionenaustauschchromatographie SIF-positiver Seren bei pH 5 erfolgte die Elution der suppressiven Aktivität in zwei bis drei Peaks gemeinsam mit alpha- und beta-Globulinen und Albumin. Es konnte allerdings keine so gute Abtrennung der Immunglobuline erzielt werden.

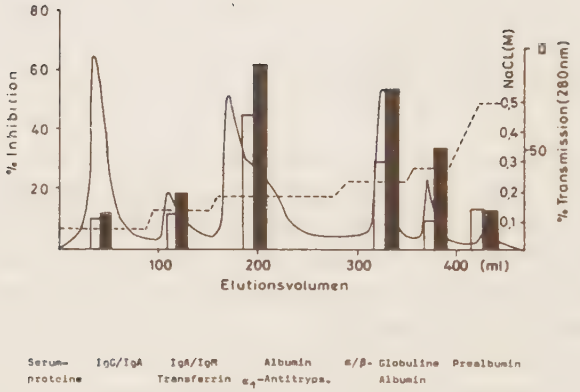


Abb. 1: Elutionsprofil und Verteilung der SIF-Aktivität nach Chromatographie SIF^+ und SIF^- Seren an DEAE-Sephacel

Transmission (280 nm) (_____), Nacl-Konzentration (_ _ _)
% Inhibition: SIF^+ (n=10) (■), SIF^- (n=7) (□)
Die Werte für die Inhibition sind Mittelwerte (Einzelergebnisse siehe Tab. 7,Anhang) und beziehen sich auf 40 µg Protein/kultur. Die Serumproteine wurden mit IEP und LC-Partigenplatten bestimmt.

B. Gelfiltration an Sephadex G-150

Durch Gelfiltration SIF-positiver Seren an Sephadex G-150 konnte SIF von den Makroglobulinen und Immunglobulinen abgetrennt werden. Der suppressive Faktor eluierte in Fraktion III (120000 d - 40000 d) gemeinsam mit Transferrin, Albumin, $alpha_1$-Antitrypsin und $alpha_1$-saures-Glycoprotein.
Nach Fraktionierung SIF-negativer Seren an Sephadex G-150 konnte in Fraktion III ebenfalls eine die Lymphozytenproliferation inhibierende Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 2).

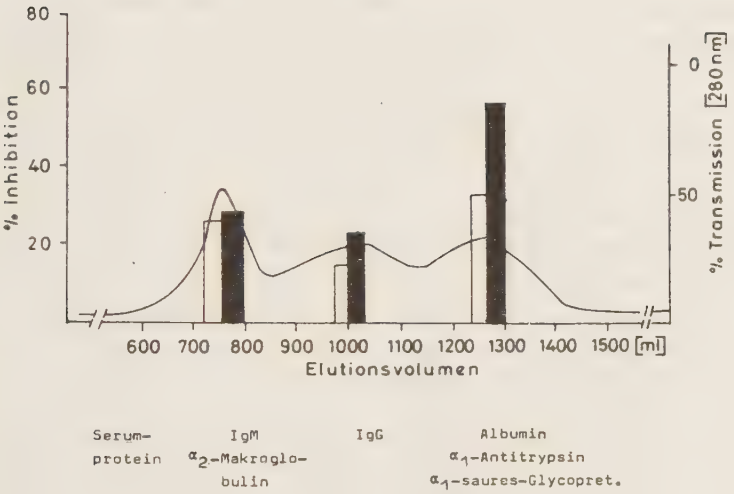


Abb. 2: Elutionsprofil und Verteilung der SIF-Aktivität nach Chromatographie SIF^+ und SIF^- Seren an Sephadex G-150

Transmission (280 nm) (_____)

% Inhibition: SIF^+ Seren (n=7) (■), SIF^- Seren (n=5) (□)

Die in der Abbildung angegebenen Inhibitionswerte sind Mittelwerte (Einzelergebnisse siehe Tab. 8, Anhang) und beziehen sich auf 40 µg Protein/Kultur. Die Serumproteine wurden durch IEP und mit LC-Partigenplatten bestimmt.

C. Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration aktiver Fraktionen

Nach Ionenaustauschchromatographie der aktiven Fraktion III (G-150) SIF-positiver Seren an DEAE-Sephacel konnte in den Fraktionen III und IV SIF-Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Fraktionierung SIF-positiver Seren eluierte nur in Peak III (Albuminpeak) eine starke Aktivität, während in Peak IV nur noch schwache und in Peak V keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die Fraktionierung von Peak III (G-150) SIF-negativer Seren führte wie bei der Chromatographie des Serums nur in Fraktion III zu Aktivität (Abb. 3).

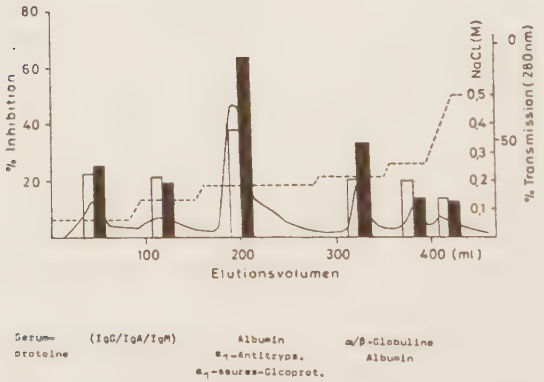


Abb. 3: Ionenaustauschchromatographie von Fraktion III (G-150) SIF-positiver und SIF-negativer Seren an DEAE-Sephacel

Transmission (280 nm) (____), NaCl-Konzentration (_ _ _)
% Inhibition: SIF^+ (n=4) (■), SIF^- (n=4) (□)
Die Inhibitionswerte sind Mittelwerte (Tab. 9, Anh.) und beziehen sich auf 40 µg Protein/Kultur

Durch Gelfiltration der aktiven DEAE-Fraktionen III und IV SIF-positiver Seren an Sephadex G-100 wurden diese in zwei Peaks aufgetrennt. Während nach dieser Auftrennung bei DEAE-Fraktion III nur in Peak II (Albuminpeak) Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde bei DEAE-Fraktion IV auch in Peak I eine schwache Aktivität gemessen (Abb. 4).

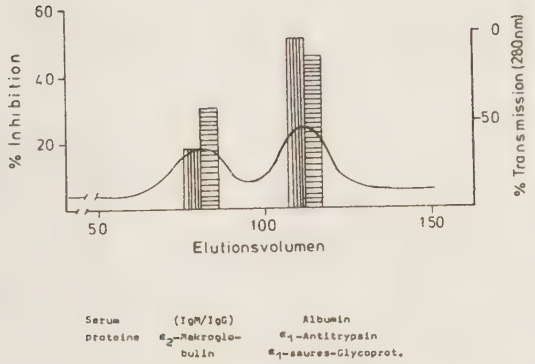


Abb. 4: Gelfiltration der aktiven DEAE-Fraktionen III und IV SIF-positiver Seren an Sephadex G-100

Transmission (280 nm) (_____)
% Inhibition: DEAE-Fr. III (n=4) (▥), DEAE-Fr. IV (n=4) (▤)
Die Inhibitionswerte sind Mittelwerte und beziehen sich auf 40 µg Protein/Kultur (Tab. 10, Anh.).

D. Affinitätschromatographie

Durch Affinitätschromatographie SIF-positiver Seren und Fraktionen an Cibacron Blue Affinity Gel ("Affi Gel Blue") konnten die alpha-Globuline von Albumin getrennt werden, da dieses Gel Albumin unspezifisch bindet.
Während die alpha-Globuline gemeinsam mit den übrigen Serumproteinen im PBS-Durchlauf eluierten , wurde Albumin zwischen 75 % und 96 % von "Affi Gel Blue" absorbiert. In diesem Durchlauf konnte nur in drei von zwölf Fällen eine schwache SIF-Aktivität nachgewiesen werden (Tab. 10, Anhang).
Durch Elution mit einer 2 M NaCl-Lösung konnte Albumin mit einer Ausbeute von 60 % bis 85 % wieder von "Affi Gel Blue" gelöst werden. In diesem Eluat konnte in allen Fällen eine starke SIF-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 5).

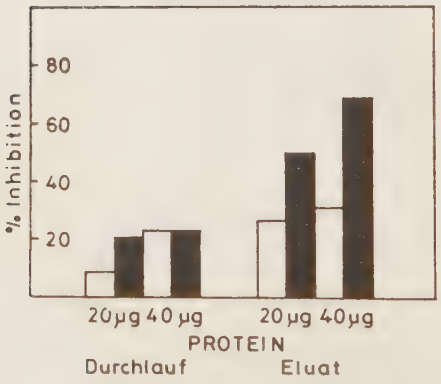


Abb. 5: SIF-Aktivität in Durchlauf und Eluat nach Chromatographie SIF^+ und SIF^- Seren an "Affi Gel Blue"

Die Inhibitionswerte sind Mittelwerte für 12 SIF^+ und 8 SIF^- Seren oder Fraktionen (Sephadex G-150) (Tab. 11, Anh. SIF^+ (■), SIF^- (□)

Nach Chromatographie SIF-negativer Seren an "Affi Gel Blue" konnte im Eluat ebenfalls schwache SIF-Aktivität nachgewiesen werden. Im Eluat sowohl SIF-positiver Seren/Fraktionen als auch SIF-negativer Seren konnte weder durch Immunelektrophorese noch mit verschiedenen Anfärbemethoden in der SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese eine andere Substanz als Albumin nachgewiesen werden (Abb. 6)

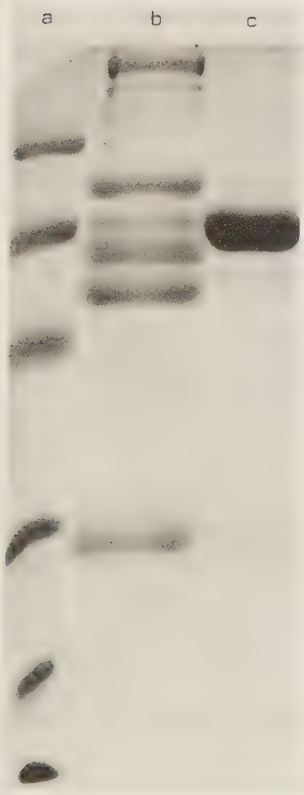


Abb. 6: SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese eines Durchlaufs und Eluats einer SIF-positiven Fraktion III (G-150) nach Chromatographie an "Affi Gel Blue"

a) Eichproteine[1)]
b) Durchlauf
c) Eluat

1) Phosphorylase B (94000), Albumin (67000), Ovalbumin (43000), Carboanhydrase (30000), Trypsin-Inhibitor (20100), Lactalbumin (14400)

Zusammenfassend zeigte sich; durch Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration SIF-positiver Seren konnte SIF gemeinsam mit den alpha-Globulinen und Albumin eluiert werden. Bei der Ionenaustauschchromatographie verteilte sich die Aktivität auf drei Fraktionen, während sie bei der Gelfiltration in einem Peak (120000 d - 40000 d) eluierte. Durch Affinitätschromatographie an Cibacron Blue Affinity Gel wurde Albumin durch Adsorption an dieses Gel von den übrigen Serumproteinen einschließlich der alpha-Globuline abgetrennt.(Tab. 2, Abb. 7). Durch Elution mit 2 M NaCl-Lösung konnte Albumin wieder vom Gel gelöst werden und in diesem Eluat fand sich auch die SIF-Aktivität wieder.
Wenn man die gleichen Chromatographieverfahren auf SIF-negative Seren anwandte, konnte man in den entsprechenden Fraktionen ebenfalls eine schwache, die Lymphozytenproliferation hemmende Aktivität nachweisen.

Tabelle 2: Nachweis von alpha-Globulinen und Albumin in SIF-positiven Fraktionen nach verschiedenen Chromatographiearten

	$alpha_1$-saures-Glycoprotein	$alpha_1$-Antitrypsin	$alpha_2$ Makroglobulin	Albumin
F III (G-150)	++	++	-	++
F III (DEAE)	+	++	+	++
F IV (DEAE)	-	++	++	+
OU (Affi Gel)	+	+	+	(+)
EL (Affi Gel)	-	-	-	+++

Die Proteine wurden mit LC-Partigenplatten nachgewiesen.

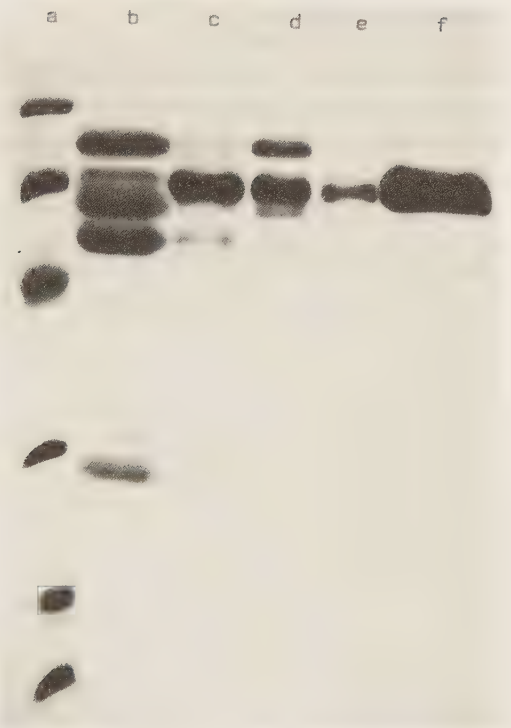


Abb. 7: Gelelektrophoretische Analyse (10 % Acrylamid) SIF-aktiver Fraktionen nach verschiedenen Chromatographieverfahren

a) Eichproteine[1], b) Fraktion III (DEAE), c) Fraktion IV (DEAE) d) Fraktion III (G-150), e) Albumin (Medac) f) Eluat ("Affi Gel Blue")

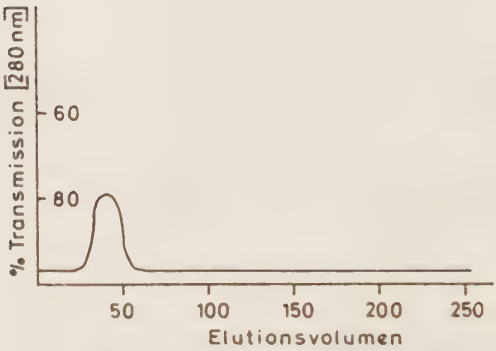
1) Phosphorylase B (94000), Albumin (67000), Ovalbumin (43000), Carboanhydrase (30000), Trypsin-Inhibitor (20100) Lactalbumin (14400)

2. Trennung von SIF von Albumin

Durch Gelfiltration und Ultrafiltration mit hohen Salzkonzentrationen und Extraktion mit organischen Lösungsmitteln wurde versucht eine Trennung von SIF und Albumin zu erreichen.

A. Chromatographie an Sephadex G-75

Durch Chromatographie SIF-positiver Eluate an Sephadex G-75 in 5 M NaCl-Lösung konnte SIF teilweise von Albumin getrennt werden (Abb. 8).



	F I	F II			
SIF^- (n=4)	35	30			
SIF^+ (n=5)	61	50			
	F I	F IIa	F IIb	F IIc	F IId
	60	55	59	48	36

Abb. 8: Gelchromatographie SIF-positiver Eluate an Sephadex G-75 in 5 M NaCl-Lösung

Die Ergebnisse beziehen sich auf 40 µg Protein für Fraktin I bzw. 100 µ für Fraktion II (Einzelergebnisse: Tab. 12, Anh.

Es wurden zwei Fraktionen gebildet; der Albuminpeak und als Fraktion II die darauffolgenden 200 ml, die keine Absorption bei 280 nm zeigten. In beiden Fraktionen konnte nach Konzentration auf die Ausgangsvolumina eine SIF-Aktivität von ungefähr 50 % gemessen werden. Eine weitere Aufteilung von Fraktion II in vier Teilfraktionen von 50 ml ergab kein klares Aktivitätsmaximum in einer der Teilfraktionen, sondern die Aktivität nahm allmählich ab.

B. Molekularfiltration

Um eine bessere Abtrennung und von Albumin und eine bessere Abschätzung des Molekulargewichts zu erzielen, wurden Eluate SIF-positiver und SIF-negativer Seren 30 Minuten unter leichtem Rühren in 5 M NaCl inkubiert und anschließend über Molekularfilter der Trenngröße 10000 d filtriert. Das Filtrat wurde über einen Filter mit der Trenngrennze 500 d ein weiteres Mal filtriert. Nach dem Entsalzen wurden beide Fraktionen in der Lymphozytenkultur getestet.
Wie Abbildung 9 zeigt konnte mit dieser Methode SIF fast vollständig von Albumin abgetrennt werden. Auch nach Konzentration auf ein zwanzigstel des Ausgangsvolumens konnte in der SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese weder mit Coomassie Blue, Amido Schwarz oder "Stains all" eine Substanz nachgewiesen werden (Abb. 10)

C. Extraktion von SIF

Eluate und Filtrate (<10000 d) SIF-positiver Seren wurden mit Chloroform/Methanol (1/1) extrahiert. Nach Abdampfen der Lösungsmittel wurden die beiden Fraktionen in RPMI aufgenommen und in der Lymphozytenkultur auf ihre SIF-Aktivität getestet.

Durch diese Extraktion konnte eine teilweise Trennung von SIF und Albuminerreicht werden. Dabei verteilte sich

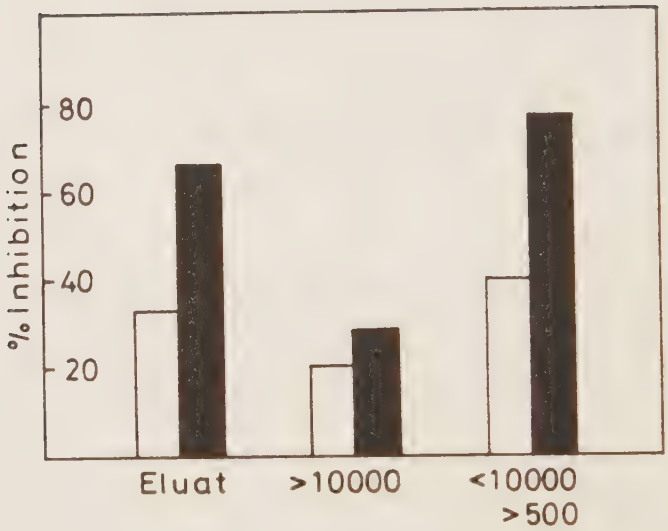


Abb. 9: Verteilung der Aktivität auf Überstand und Filtrat nach Molekularfiltration von Eluaten SIF-positiver und SIF-negativer Seren über Filter der Trenngröße 10000 d

SIF-positive Seren (n=6) (■), SIF-negative Seren (n=3) (□) Die Inhibitionswerte sind Mittelwerte (Tab. 13, Anh.) und beziehen sich auf 40 µg (Eluat, Überstand) bzw. 100 µl (Filtrat)

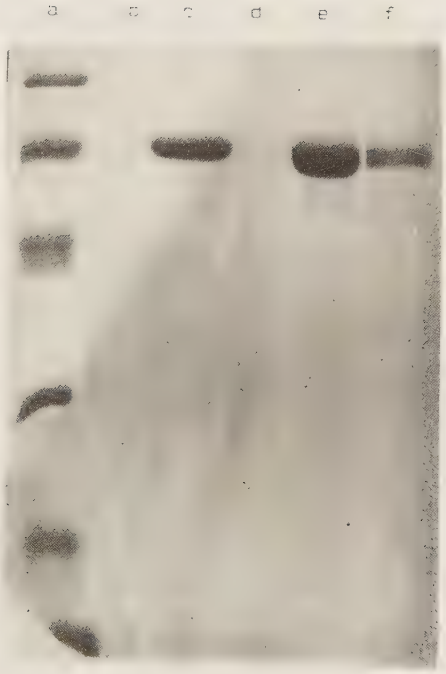


Abb. 10: SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Fraktion I und II (G-75) und Überstand und Filtrat nach Molekularfiltration über Filter der Trenngrenze 10000 Dalton

a) Eichproteinen[1], b) Filtrat, c) Überstand, d) Fraktion II (G-75) e) Fraktion I (G-75), f) Albumin (Paestel)

1) Phosphorylase B (94000), Albumin (60000), Ovalbumin (43000), Carboanhydrase (30000), Trypsininhibitor (20100), Lactalbumin (14400)

die Aktivität zu ungefähr gleichen Teilen auf beide Fraktionen. Auch beim Ausschütteln der albuminfreien Filtrate (<10000 d) konnte in beiden Fraktionen Aktivität nachgewiesen werden, aber hier wurde die stärkere Inhibition durch die organische Phase bewirkt (Abb. 11)

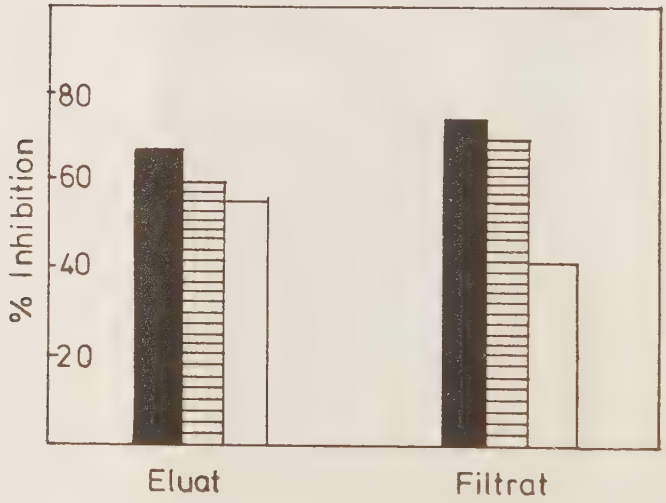


Abb. 11: Verteilung der SIF-Aktivität auf organische und wässrige Phase nach Extraktion des Albumineluats ("Affi Gel Blue") und des albuminfreien Filtrates (<10000 d).

Ausgangsfraktion (■), organische Phase (▤),
wässrige Phase (□)
Die Inhibitionswerte sind Mittelwerte (Einzelergebnisse: Tab. 14, Anh.) und beziehen 40 µg Eluat bzw. 100 µl Filtrat

SIF-Aktivität konnte nur nachgewiesen werden, wenn die Kulturen direkt in den Glasröhrchen durchgeführt wurden, in denen die Fraktionen durch Rotationsverdampfung getrocknet wurden. Dagegen konnte keine Aktivität nachgewiesen werden, wenn versucht wurde die getrocknete Substanz in Puffer aufzunehmen und die Kulturen in Mikrotiterplatten durchgeführt wurden.

D. Kontrollen

Zur Kontrolle wurden Affinitätschromatographie, Molekularfiltration und Extraktion mit käuflichem Humanalbumin und einem Gemisch von Immunglobulin M, Immunglobulin G, Transferrin, $alpha_1$-Antitrypsin, $alpha_1$-saures-Glycoprotein und Albumin in serumentsprechenden Konzentrationen durchgeführt. Ebenso wurden die entsprechenden Reinigungsschritte mit PBS, 5 M NaCl und Chloroform/Methanol (1/1) durchgeführt. Durch diese Kontrollfraktionen wurde jedoch keine Hemmung der Lymphozytenproliferation bewirkt.

E. Vergleich der SIF-Aktivität nach verschiedenen Chromatographieschritten

Eine Titration SIF-positiver Seren, von Eluaten ("Affi Gel Blue") und Filtrat (<10000 d) SIF-positiver Seren ergab für Serum und Eluat sehr ähnliche Kurven. So betrug bei beiden bei einer Verdünnung von 1:10 die Inhibition noch 50 % und die Aktivitätsgrenze von 30 % wurde bei einer 1:20 Verdünnung erreicht. Dagegen verlief die Kurve des proteinfreien Filtrats (<10000 d) wesentlich steiler. 50 % Hemmung wurden schon bei einer Verdünnung von 1:2 und 30 % Hemmung bei einer Verdünnug von 1:4 erreicht.(Abb. 12).

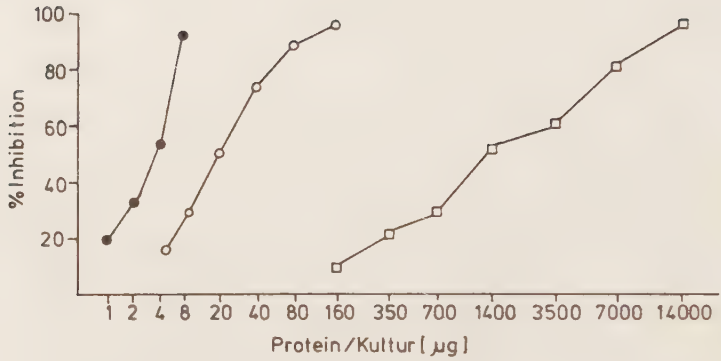


Abb. 12: Titration der SIF-Aktivität auf verschiedenen Reinigungsstufen

Serum (□———□), Eluat (○———○), Filtrat (< 10000 d) (●———●)
Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei Versuchen.

3. Charakterisierung von SIF durch Dünnschichtchromatographie

A. Analytische Dünnschichtchromatographie

10 µl oder 20 µl Filtrat (< 10000 d) wurden auf HPTLC Platten aufgetragen und mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser (62/38/8) eluiert. Die Platten wurden anschließend mit verschie-

denen Nachweisreagenzien behandelt (Tab. 3). Außerdem wurden 10 µl

Tabelle 3: Positive und negative Reaktionen mit verschiedenen Färbereagenzien nach DÜnnschichtchromatographie SIF-positiver Filtrate (< 10000 d) auf HPTLC Fertigplatten KG 60 F 254 mit Chloroform/Methanol/Wasser (62/38/8) als Fließmittel

Färbereagenz	Nachweis für	RF-Werte
Ammoniummolybdat-Perchlorsäure	Phosphorsäureester (Zuckerphosphate)	-
Anilinphtalat	Reduzierende Zucker	-
Anisaldehyd-Schwefels.	Steroide, Zucker	0,63 (0,56-0,70)
Antimon(III)-chlorid	Carotinoide, Steroidsapogenine, Steroidglycoside, Terpenderivate	-
2,6-Dichlorphenolindophenol-Natrium	Organische Säuren, Ketosäuren	0,67 (0,64-0,70)
2,4-Dinitrophenylhydrazin	Prostaglandine	-
Jod	Organische Verbindungen (Doppelbindungen)	-
Kaliumpermanganatlösung (alkalisch)	Reduzierende Verbindungen arom. Polycarbonsäuren	-
Ninhydrinlösung	Aminosäuren, Amine, Aminozucker	-
Schwefelsäure (50 %)	Lipide, Steroide allgem. Nachweisreagenz	0,65 (0,56-0,74)
Vanillin-Phosphorsäure	Steroide	-

eines Gallensäurengemisches (1mg/ml) und 10 µl Prostaglandin B_2 (1mg/ml) mit dem gleichen Fließmittel chromatographiert.
Wie in Tabelle 3 und Abbildung 13 zu sehen ist, ergaben sich positive Reaktionen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure, 2,6-Dichlorphenol-indophenol und mit Schwefelsäure (50 %) mit ähnlichen RF-Werten. In diesem RF-Bereich konnte auch ein schwacher UV-Quench beobachtet werden.
Bei der Anfärbung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure konnte ein hellgrau und ein dunkelgrau angefärbter Bereich unterschieden werden und die Bande wies wie bei der Anfärbung mit Schwefelsäure ein starkes "Tailing" auf. Daraus kann man schließen, daß diese Fraktion noch mehr als eine Substanz enthält. Außerdem konnte mit Schwefelsäure noch eine zweite Bande (0-0,1) an der Auftragsstelle nachgewiesen werden.
Die positiven Reaktionen zeigen eine lipidartige Substanz und eine Carboxylfunktion an. Das Filtrat ließ sich jedoch nicht mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin anfärben, während sich bei Prostaglandin B_2 (0,78) nach wenigen Minuten eine kräftig gelbe Bande bildete. Die Gallensäuren eluierten in diesem Lösungsmittelgemisch in der Lösungsmittelfront (0,94-1).
Außerdem wurden das Filtrat und Prostaglandin B_2 auf zuvor mit Silbernitrat behandelten HPTLC Platten mit einem Gemisch von Äthylacetat/Essigsäure /Methanol/2,2,4-Trimethyl-Pentan/Wasser (110/30/35/10/100) als Fließmittel chromatographiert. Für das Filtrat ergaben sich wieder zwei Banden; eine an der Auftragstelle und die zweite bei einem RF-Wert von 0,46. Das Prostaglandin hatte einen RF-Wert von 0,76; der Nachweis erfolgte mit Schwefelsäure.

B. Präparative Dünnschichtchromatographie und Chromatographie an Kieselgel 60

1ml Filtrat wurde auf eine präparative Dünnschichtplatte KG 60 aufgetragen und die, in der analytischen Dünnschichtchromatographie nachgewiesenen Banden und eine zusätzliche Kontrollbande abgekratzt und getestet. Da auch der Kontrollwert eine starke Hemmung bewirkte, konnte mit dieser Methode nicht entschieden werden, welcher Bande die inhibierende Wirkung zugeordnet werden

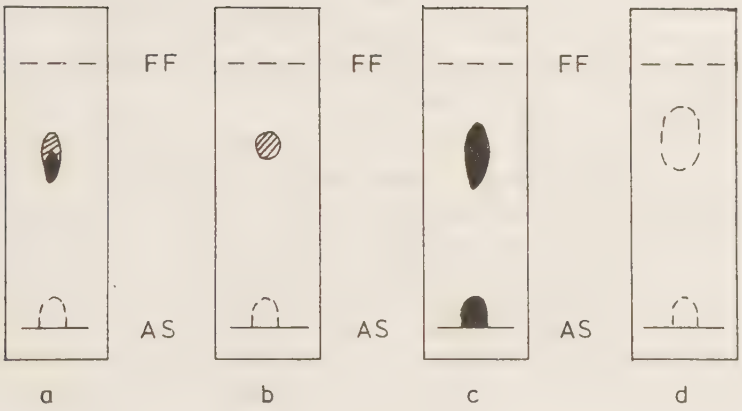


Abb. 13: Dünnschichtchromatographie von Filtraten (< 10000 d) SIF-positiver Seren auf HPTLC Platten KG 69 F 254 mit Chloroform/Methanol/Wasser (62/38/8) als Fließmittel

AS: Auftragsstelle FF: Fließmittelfront
Nachweis mit a) Anisaldehyd-Schwefelsäure, b) 2,6-Dichlorphenolindophenol, c) Schwefelsäure (50 %), d) UV (254 nm)

kann. Offensichtlich bewirken in der Kieselgelschicht enthaltene Substanzen eine unspezifische Hemmung des Testsystems.
Um Effekte durch derartige unspezifische Hemmung auszuschließen wurde eine Kieselgel 60-Säule mit 50 ml Fließmittel vorgewaschen. Anschließend wurde 1 ml Filtrat aufgetragen und mit 50 ml Lösungs-

mittelgemisch eluiert. Eine dritte Fraktion wurde durch Nachwaschen mit weiteren 50 ml Elutionsmittel erhalten. Alle drei Fraktionen wurden auf dem Rotationsverdampfer bis fast zur Trockne eingeengt mit PBS auf auf 1 ml aufgefüllt und getestet. Hierbei bewirkte nur Fraktion II (Tab. 4) eine Hemmung während die Kontrollen I und III inaktiv waren.

Tabelle 4: Chromatographie SIF-aktiver Filtrate an Kieselgel 60 in Chloroform/Methanol/Wasser (62/38/8).

Fraktion I	Fraktion II	Fraktion III
12	98	25
22	87	18
14	49	13

Die Ergebnisse sind in Prozent Inhibition angegeben und beziehen sich auf 100 µl Fraktion/Kultur.

3. Sonstige Ergebnisse

A. Inkubation mit Proteinase K

Albuminhaltige und albuminfreie, aktive Fraktionen wurden bei 37° C mit gelgebundener Proteinase K inkubiert und nach Abzentrifugieren des Gels in der Kultur getestet. Als Kontrolle wurde LIP ein Protein aus Leberextrakten, das die Lymphozytenproliferation hemmt unter den selben Bedingungen inkubiert und getestet. Während die Inhibition durch die SIF-Fraktionen nur unwesentlich abnahm, war bei LIP ein starker Aktivitätsverlußt zu bemerken (Tab. 5).

Tabelle 5: Vergleich der Aktivität von SIF und LIP vor und nach Inkubation mit Proteinase K

	vorher	nachher
Eluat	91	94
Eluat	88	80
G-150 (III)	65	67
Filtrat	69	68
Filtrat	97	91
G-75 (II)	63	59
LIP	99	25
LIP	91	32

B. Säurestabilität von SIF

SIF-positive Seren und Fraktionen wurden mit Essigsäure auf die gewünschten ph-Werte eingestellt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Dialyse gegen PBS, Abzentrifugation der ausgefallenen Proteine und Konzentration auf das Ausgangsvolumen wurden die Seren und Fraktionen in der Kultur getestet. Aus Tabelle 6 ist ersichtlich, daß SIF sowohl an Albumin gebunden als auch frei relativ säurestabil ist.

Tabelle 6: Abnahme der SIF-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert

	pH 8	pH 6	pH 4	pH 3	pH 2
Serum	78	70	68	44	16
Eluat	74	71	69	43	8
Filtrat	90	87	65	45	12

Die Ergebnisse sind in Prozent Inhibition angegeben, beziehen sich auf 40 µg Protein bzw. 100 µl Filtrat und sind Mittelwerte aus drei Versuchen.

C. Hitzestabilität von SIF

Im Gegensatz zur Stabilität gegenüber niederen pH-Werten ist SIF nicht stabil gegen hohe Temperaturen. Die Aktivität nimmt zwar bei einer Inkubation über eine Stunde bei 56° C nur unmerklich ab, geht aber nach zehn minütiger Inkubation bei 70° vollständig verloren.

IV. D I S K U S S I O N

Untersuchungen der letzten fünfzehn Jahre haben gezeigt, daß durch Seren von Patienten mit verschiedenen Autoimmun-, Infektions- oder Tumorerkrankungen die Mitogen- oder Antigen-induzierte Lymphozytenproliferation gehemmt wird. Bei Untersuchungen, die der näheren Charakterisierung solcher, immunsuppressiver Faktoren galten, wurden Akutphaseproteine und alpha-Globuline (Sipe und Rosenstreich, 1981), Lipoproteine (Curtiss und Edgington, 1976) und Immunkomplexe (Thomas et al., 1976) diskutiert.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine teilweise Charakterisierung des 1978 von Brattig in den Seren von Patienten mit akuter und chronisch aggressiver Hepatitis beschriebenen Serum-inhibitionsfaktors (SIF) erreicht werden.

Bei der Fraktionierung SIF-positiver Seren an Sephadex G-150 und Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel konnte der inhibierende Faktor gemeinsam mit alpha-Globulinen und Albumin eluiert werden, wie durch SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese und Immunelektrophorese gezeigt wurde. Während bei der Gelfiltration die Aktivität in einem Peak eluierte, verteilte sie sich bei der Ionenaustauschchromatographie über mehrere Fraktionen.
Diese Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen von Nakao et al. (1978) überein, die bei der Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose von Patientenseren mit verschiedenen Lebererkrankungen eine Hemmung der Lymphozytenproliferation durch Fraktionen, die alpha- und beta-Globuline enthielten, beobachteten.
Vergleichbare Ergebnisse erhielten auch Nimberg et al. (1975), die bei der Fraktionierung von Seren von Krebspatienten die stärkste Inhibition mit beta-Globulinen und Albumin assoziiert fanden. Bei der Untersuchung von Ascitesflüssigkeit von Patientinnen mit Ovarcarcinomen bzw. Pleuralflüssigkeit von Krebspatienten fanden Hess et al. (1980) und Ting et al. (1977) sowohl

nach Gelfiltration als auch Ionenaustauschchromatographie die Aktivität in Assoziation mit alpha-Globulinen und Albumin. Im Gegensatz hierzu fanden Badger et al. (1978,1977) nach Gelfiltration von Ascitesflüssigkeiten von Patienten mit verschiedenen Tumor- und Lebererkrankungen an Sephadex G-200 den inhibierenden Faktor in der Makromolekülfraktion. Oh und Molten beschrieben 1981 ein saures Protein mit einem Molekulargewicht von 50000 d in den Ascitesflüssigkeiten von Krebspatienten.
Bei der Chromatographie SIF-negativer Seren unter den gleichen Bedingungen konnte in den entsprechenden Fraktionen eine schwache SIF-Aktivität beobachtet werden, die sich bei der Ionenaustauschchromatographie aber auf eine Fraktion beschränkte.
Die immunsuppressive Wirkung alpha-Globulin-reicher Fraktionen aus Normalseren wurde schon von Kamrin (1959) und Mowbray (1963) im Rahmen von Transplantationsversuchen beschrieben.
Weitere Berichte über immunsuppressive Effekte durch alpha-Globuline und Albumin enthaltende Fraktionen nach Ionenaustauschchromatographie gibt es von Nelken (1973), Occhino et al. (1973), Voorwort-Hawking und Michael (1977), Garner et al. (1980) und Goren und Nelken (1980).

Durch Chromatographie an Cibacron Blue Affinity Gel konnte Albumin bis zu 95 % aus den SIF-positiven Seren und Fraktionen entfernt werden. Dies führte in der Durchlauffraktion, in der auch die alpha-Globuline eluierten, zu einer starken bis vollständigen Reduzierung des inhibierenden Effekts. Durch Elution mit 2 M NaCl konnte ein Großteil des Albumins wiedergewonnen werden. In diesem Eluat, in dem durch Immunelektrophorese und SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese nur Albumin nachgewiesen werden konnte, wurde eine starke immunsuppressive Aktivität gemessen. Auch der von Hess et al. 1980 beschriebene Faktor wurde durch Chromatographie an "Affi Gel Blue" gemeinsam mit Albumin absorbiert, konnte aber im Gegensatz zu SIF nicht wieder von der Säule eluiert werden.
Die für eine Anzahl von Proteinen beschriebenen immunsuppressiven

Effekte werden durch kleine Effektormoleküle bewirkt, denen diese Proteine als Carrier dienen. So sind Albumin, alpha-Fetoprotein und $alpha_2$-Makroglobulin als Carrier bekannt (Papermaster et al. 1980; Tomasi, 1978; Hubbard, 1978).
Durch sequentielle Molekularfiltration SIF-positiver Albuminfraktionen in 6 M NaCl konnte das aktive Agens von Albumin getrennt werden und ein Molekulargewicht zwischen 10000 d und 500 d bestimmt werden.
Occhino et al. (1973), Glasgow et al. (1973) und Garner et al. (1980) konnten zeigen, daß inhibierende Wirkung der immunregulativen alpha-Globuline (IRA) auf ein Peptid zurückzuführen ist, das durch Ultrafiltration bei hohen Salzkonzentrationen bzw. einer Kombination von hoher Salzkonzentration und niederem pH von den alpha-Globulinen abgetrennt werden kann. Ähnliche Ergebnisse erhielten Nimberg et al. (1975) bei der Ultrafiltration der aus den Seren von Krebspatienten gewonnenen, immunsuppressiven alpha-Globulinfraktionen.
Dagegen konnten Hess et al. (1980) durch Ultrafiltration mit Essigsäure bei pH 3,5 keine Abtrennung einer niedermolekularen, aktiven Fraktion von den alpha-Globulinen erreichen.
Das Molekulargewicht dieser immunsuppressiven Peptide konnte durch Gelfiltration (Garner et al. 1980) bzw. Ultrazentrifugation (Occhino et al., 1973) auf 5000 d bis 10000 d geschätzt werden.
Von der von Nelken 1973 beschriebenen, inhibierenden Serumfraktion mit einem Molekulargewicht um 70000 d konnte durch präparative Polyacrylamid Gelelektrophorese ein Peptid der Größenordnung 10000 d bis 14000 d abgespalten werden (Goren und Nelken, 1983).

Des weiteren wurden Fibrinogenspaltprodukte mit einem Molekulargewicht von 1650 d aus Normalseren und aus Seren von Patienten mit Carcinomen als Inhibitoren der Lymphozytenproliferation beschrieben (Girman et al., 1975; Plow und Edgington, 1982).
SIF zeigte zwar in Bezug auf die Coelution mit alpha-Globulinen und Albumin sowie auf die Molekülgröße und die Abspaltbarkeit vom Carriermolekül durch hohe Salzkonzentrationen gewisse Über-

einstimmungen mit den von Occhino et al. (1973), Nimberg et al. (1975) und Garner et al. (1980) beschriebenen, niedermolekularen Faktoren; aber andererseits zeigte die von Albumin und den alpha-Globulinen abgetrennte, SIF-positive Fraktion keine Absorption bei 280 nm noch ließ sich nach SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese dieser Fraktion eine Anfärbung mit Coomassie Blue erzielen. Auch bei der Behandlung von Dünnschichtchromatogrammen dieser Fraktion mit Ninhydrin ergab sich keine positive Reaktion.

Dagegen konnten einige Ähnlichkeiten mit einem Lipid festgestellt werden, das Wolf und Merler 1979 im Kulturüberstand von Lymphozyten gefunden haben. 1982 gelang es Wolf und Andreoni diese Lipid Suppressor Substance (LSS) auch im Normalserum nachzuweisen.
Ebenso wie SIF durch Extraktion mit Chloroform/Methanol von Albumin abgetrennt werden kann, läßt sich der von Wolf und Andreoni (1982) beschriebene Faktor von seinem Carrier, einem Protein mit einem Molekulargewicht zwischen 100000 d und 150000 d durch Chloroform/Methanol abspalten.
Beide Faktoren lassen sich bei Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten mit 50 %iger Schwefelsäure nachweisen und zeigen keine positiven Reaktionen mit Ninhydrin oder Ammoniummolybdat. Der in dieser Arbeit beschribene Faktor reagierte außerdem positiv mit Anisaldehyd-Schwefelsäure und 2,6-Dichlorphenol-indophenol. Wolf und Merler (1979) und Wolf und Andreoni (1982) erwähnen keine Anfärbeversuche mit diesen Reagenzien, konnten aber eine positive Reaktion mit Jod beobachten, während SIF mit Jod keine Reaktion zeigte.
Hinsichtlich der RF-Werte ergeben sich Unterschiede, so hat die von Wolf und Andreoni beschriebene, aktive Substanz einen RF-Wert von 0,34 während die RF-Werte für SIF bei den verschiedenen positiven Nachweisreaktionen zwischen 0,63 und 0,68 lagen. Diese etwas von einander abweichenden RF-Werte und das starke "Tailing" lassen darauf schließen, daß die bei RF-Wert 0,65 nachgewiesen Fraktion noch mehr als eine Substanz enthält. Außerdem konnte mit 50 %iger Schwefelsäure eine zweite Fraktion mit einem RF-Wert von 0 bis 0,1 nachgewiesen werden.

Da bei der präparativen Dünnschichtchromatographie SIF-positiver Filtrate eine unspezifische Hemmung des Testsystems durch die Kontrollen nicht beseitigt werden konnte, wurde das Filtrat auf eine Kieselgelsäule aufgetragen und mit dem gleichen Fließmittel wie in der Dünnschichtchromatographie eluiert. In diesem Eluat konnte SIF-Aktivität nachgewiesen werden. Dadurch konnte indirekt gezeigt werden, daß die Fraktion mit den RF-Werten zwischen 0,63 und 0,68 den aktiven Faktor enthält, da die zweite in der Dünnschichtchromatographie nachgewiesene Fraktion nur eine sehr geringe Affinität zu diesem Fließmittel besitzt und an der Auftragsstelle liegen bleibt.

Die hier beschriebenen Ergebnisse lassen keine Ähnlichkeit mit den von Curtiss und Edgington (1976) und Chisari (1979, 1982) beschriebenen, immunregulativen Low Density Lipoproteinen erkennen. Zu diesen gehört auch der Rosetteninhibitionsfaktor (RIF) (Chisari und Edgington, 1975), ein abnormes Very Low Density Lipoprotein mit einem Molekulargewicht von $2,5 \times 10^6$, das in den Seren von Patienten mit akuter und protrahierter Hepatitis nachgewiesen werden kann (Chisari et al., 1977; Grauer et al., 1984). Diese Lipoproteine eluieren bei der Gelfiltration mit den Makromolekülen und es gibt auch keine Hinweise auf die Abspaltung niedermolekularer, immunsuppressiver Faktoren.

Es kann auch ausgeschlossen werden, daß SIF mit den aus Leberextrakten isolierten, die Lymphozytenproliferation inhibierenden Proteinen (Chisari, 1978, 1982; Pizzo et al., 1982) identisch ist. Diese weisen große Ähnlichkeiten zu dem von Grol und Schumacher (1983) beschriebenen Liver-derived Inhibitory Protein (LIP) und dem Liver Immunoregulatory Protein (LIP) (Schrempf-Decker et al., 1983) auf. Diese Proteine besitzen zwar ein Molekulargewicht zwischen 65000 d und 70000 d, eluieren aber bei der DEAE-Ionenaustauschchromatographie bei pH 8 in der ersten, nicht bindenden Fraktion. Außerdem wurde die inhibierende Aktivität des Liver Inhibitory Protein durch Inkubation mit Proteinase K aufgehoben, während die Aktivität von SIF sowohl an Albumin gebunden als auch frei davon nur unwesentlich beeinflußt wurde.

Brusdeilin et al. konnten 1983 zeigen, daß es sich bei dem von Grol und Schumacher 1983 beschriebenen Liver-derived Inhibitory Protein um eine Arginase handelt und die beobachtete Hemmung der Lymphozytenproliferation auf den durch diese Arginase bewirkten Argininmangel zurückzuführen ist.

Trotz des Nachweises einer Carboxylfunktion durch die positive Reaktion mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol (Passera et al., 1964) und lipoider bzw. steroider Eigenschaften durch die positiven Reaktionen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure und 50 %iger Schwefelsäure (Mangold, 1967) in der Dünnschichtchromatographie dürfte es sich bei SIF um kein Prostaglandin handeln.
Besonders die Prostaglandine E werden bei Morbus Hodgkin (Bockman, 1980; Goodwin et al., 1977) und bei allergischen Prozessen (Metcalfe und Kaliner, 1981) im Zusammenhang mit immunsuppressiven Vorgängen diskutiert.
SIF ließ sich nicht mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, einem empfindlichen Nachweisreagenz für Prostaglandine (Bygdeman und Samuelsson, 1965) anfärben. SIF zeigte keine positive Reaktion mit Jod; besitzt also im Gegensatz zu den Prostaglandinen keine Doppelbindung (Mangold, 1967). Bei Dünnschichtchromatographie auf mit Silbernitrat beschichteten Platten nach Green und Samuelsson (1964) wurde für SIF ein RF-Wert von 0,46 ermittelt. Dieser RF-Wert entspricht keinem der von Green und Samuelsson für PGE_1 (0,8), PGE_2 (0,69) oder PGE_3 (0,35) ermittelten RF-Werte.
Auch Gallensäuren können die in vitro Lymphozytenproliferation hemmen (Gianni et al., 1980). Da die als Kontrolle mitchromatographierten Gallensäuren im Gegesatz zu SIF sich in der Fließmittelfront wiederfanden und SIF bei der Anfärbung mit Anisaldehyd-Schuefelsäure auch nicht die typischen blauen oder rosa Flecken zeigte (Neher,1967), dürfte es sich bei SIF auch nicht um eine Gallensäure handeln.

Dagegen bestehen einige Übereinstimmungen mit dem von Nakao et al. 1978 beschriebenen, immunsuppressiven Faktor aus Seren von Patienten mit verschiedenen chronischen und akuten Lebererkrankungen. So eluieren beide Faktoren bei der Anionenaustauschchromatgraphie

gemeinsam mit Albumin und alpha-Globulinen in mehreren Fraktionen. Da Nakao et al. in diesen Seren keinen Anstieg der alpha-Globulinkonzentration im Vergleich zu Normalseren feststellen konnten, läßt sich nicht ausschließen, daß die beobachtete Hemmung der Lymphozytenproliferation auf einen niedermolekularen Faktor zurückzuführen ist, der Albumin oder ein alpha-Globulin als Carrier benutzt.

Zur Erklärung des heterogenen Verhaltens von SIF bei der Ionenaustauschchromatographie gibt es zwei Möglichkeiten. So kann die ursprünglich im Serum beobachtete Aktivität durch mehrere Faktoren hervorgebracht werden, die bei der Ionenaustauschchromatographie voneinander getrennt werden. Es kann auch spekuliert werden, daß der spezifische Carrier durch den im Verlauf der Immunreaktion vermehrt produzierten Faktor abgesättigt wird, so daß er sich unspezifisch an andere Proteine anlagert (Tomasi, 1978). Außerdem ist die Heterogenität in Bezug auf elektrische Ladung oder auch Molekülgröße ein bei vielen immunregulativen Faktoren beobachtetes Phänomen (Nelson, 1976; Oppenheim, 1981).
In Bezug auf die Heterogenität zeigt SIF einige Ähnlichkeiten mit Serum Amyloid A (SAA), das im Normalserum nachgewiesen werden kann und bei akuten und chronischen Viruserkrankungen in größeren Mengen produziert wird (Shainkin-Kestenbaum et al. 1982).
So zeigt SAA hinsichtlich der elektrischen Ladung Heterogenität und wird bei Anionenaustauschchromatographie in verschiedenen Peaks eluiert (Skogen et al., 1983). Außerdem kommt SAA sowohl an Albumin und Prealbumin gebunden als auch in freier Form vor (Marhaug und Husby, 1981). Im Gegensatz zu SIF kommt SAA auch in Assoziation mit Lipoproteinen vor (Sletten et al., 1982). In seiner freien Form besitzt Serum Amyloid A ein Molekulargewicht zwischen 11000 d und 14000 d und hat eindeutigen Proteincharakter.

Eine eindeutige Zuordnung von SIF zu einer bestimmten Stoffklasse konnte noch nicht erzielt werden. Aber es konnte gezeigt werden, daß SIF eine an Albumin und möglicherweise auch an alpha-Globuline assoziierte, niedermolekulare Substanz ist, die in niederen Konzentrationen auch im Normalserum nachgewiesen werden kann, deren bis-

her bestimmten Eigenschaften eher auf ein Lipid als ein Peptid hinweisen.
So zeigt SIF keine Absorption bei 280 nm, läßt sich nicht mit Coomassie Blue anfärben und zeigt auch keine positive Reaktion mit Ninhydrin. Durch Inkubation mit Proteinase K konnte die Aktivität von SIF nicht beeinflußt werden.
Dagegen zeigt SIF bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung ein Verhalten, das mit dem von Phospholipiden vergleichbar ist (Dawson, 1972). Allerdings zeigt SIF keine positive Reaktion mit Ammoniummolybdat einem empfindlichen Nachweisreagenz für Phosphorsäureester (Wagner et al., 1960). Des weiteren reagierte SIF positiv mit 50 %iger Schwefelsäure und Anisaldehyd-Schwefelsäure, zwei empfindlichen aber relativ unspezifischen Nachweisreagenzien für Lipide und Steroide. Daß keine positiven Reaktionen mit Antimon(III)-chlorid und Vanillin-Schwefelsäure zu beobachten waren, dürfte auf die höhere Spezifität dieser Reagenzien zurückzuführen sein.
Auf Grund der Anfärbarkeit der Substanz mit 2,6-Dichlorphenolindophenol besitzt SIF vermutlich eine oder mehrere Carboxylgruppen. Dies müßte durch Bindung an einen Anionenaustauscher bei neutralem pH gezeigt werden können; damit wäre möglicherweise ein letzter Reinigungsschritt gegeben um dann eine eindeutige chemische Identifizierung zu ermöglichen. Außerdem sollte versucht werden durch eine Verbesserung der Extraktionsverfahren die Ausbeute an SIF zu erhöhen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der hier vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, daß der im Serum von Patienten mit akuter und chronisch aggressiver Hepatitis nachgewiesene Seruminhibitionsfaktor (SIF) eine niedermolekulare, an Albumingebundene Substanz ist.
Bei DEAE-Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration wird der Faktor gemeinsam mit alpha-/beta-Globulinen und Albumin eluiert.
Durch Affinitätschromatographie an Cibacron Blue Affinity Gel wird der Faktor gemeinsam mit Albumin von den übrigen Serumproteinen abgetrennt.
Durch Molekularfiltration über Filter der Trenngrenze 10000 Dalton und Extraktion mit Chloroform/Methanol (1/1) kann die aktive Substanz von Albumin abgetrennt werden.
Der Faktor ist sowohl in gebundener als auch in freier Form relativ unempfindlich gegen niederen pH aber sehr temperaturempfindlich.
Durch Dünnschichtchromatographie des von Albumin getrennten Faktors konnten lipoide Eigenschaften und eine Carboxylfunktion nachgewiesen werde.

VI. L I T E R A T U R

Arora, P.K., Miller, C.H.: Alpha$_1$-antitrypsin is an infector of immunological stasis. Nature 274, 589-590, 1978

Aune, T.M., Pierce, C.W.: Identification and initial characterization of a nonspecific suppressor factor (Ma-SF) produced by soluble immune response suppressor (SIRS) treated macrophages. J. Immunol. 127, 1828-1832, 1981

Badger, A.M., Cooperband, S.R., Green, J.A.: Culture conditions affecting induction and release of lymphocyte produced proliferation inhibitory factor (PIF). Cell. Immunol. 8, 12-27, 1973

Badger, A.M., Cooperband, S.R., Merluzzi, V.R., Glasgow, A.H.: Immunosuppressive activity in ascitic fluid from patients with cancer metastatic to the periteneum. Cancer Res. 37, 1220-1226, 1977

Badger, A.M., Cooperband, S.R., Beuhler, R.J.: Immunosuppressive activity and tissue polypeptide antigen content of human ascitic fluids. Cancer Res. 38, 3365-3370, 1978

Baroyen, D.V., Barinski, I.F., Shatkin, A.A.: Inhibitory effect of sera from patients with Botkin's viral hepatitis on the differantiation and mitotic activity of lymphocytes and integrity of their chromosomes in the course of serial passaging in vitro. Acta Virol. 14, 324-331, 1970

Bata, J., Cordier, G., Revillard, J.B., Bonneau, M., Latour, M.: Modulation of lymphocyte responses by serum-protease-antiprotease-system. In: Touraine, J.L., Traeger, J. eds.: Transplantation and clinical immunology XI, Amsterdam, Exerpta Medica, 59-70, 1980

Benson, M.D., Aldo-Benson, M.: Effect of purified protein SAA on immune response in vitro: Mechanism of suppression. J. Immunol. 122, 2077-2082, 1977

Bjune, G., Barnetson, R.: Plasma factors in delayed-type hypersensitivity. Augmentation of lymphocyte responses in borderline leprosy reactions. Clin. exp. Immunol. 26, 397-402, 1976

Bloom, B.R., Bennet, B.: Mechanism of reaction in vitro associated with delayed hypersensitivity. Science 153, 180-182, 1966

Bockman, R.S.: Stage dependent reduction in T colony formation in Hodgkin's disease. Coincidence with monocyte synthesis of prostaglandins. J. Clin. Invest. 66, 523-528, 1980

Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (sup. 97), 77-89, 1968

Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem. 72, 248-254,1976

Brattig, N.W.: Untersuchungen zur Bedeutung immunsuppressiver Serumfaktoren bei der akuten und chronischen Hepatitis. Dissertation, Tübingen, 1978

Brattig, N.W., Ortmanns, H., Klinge, O., Wildhirt, E., Berg, P.A.: Immunosuppressive factors in viral hepatitis. IV. Evaluation of the prognostic relevance of serum inhibitory factor (SIF) in patients with protracted and chronic viral hepatitis. Accepted in Hepatology

Brusdeilin, M., Hapke, C., Huberts, H.H., Schumacher, K.: Identification of the apparently lymphocyte-specific human liver-derived inhibitory protein (LIP) as cytoplasmic liver l-arginase. J. Immunol. 131, 2427-2431, 1983

Burgett, W.M., Greenley, L.V.: Cibacron Blue F 36 A affinity chromatography. Am. Lab. 9, 74-83, 1977

Bygdeman, M., Samuelsson, B.: Analyses of prostaglandins in human semen. Prostaglandins and related factors. Clin. Chim. Acta 13, 465-474, 1966

Chapman, S.W., Kirkpatrick, C.H.: The two step leucocyte migration inhibition factor (LIF). Its use in the evaluation of cellular imune function of patients with immunodeficiency diseases. Cell. Immunol. 37, 209-218, 1978

Chisari, F.V., Edgington, T.S.: Lymphocyte E rosette inhibitory factor: A regulatory serum protein. J. Exp. Med. 142, 1092-1107, 1975

Chisari, F.V., Routenberg, J.A., Fiala, M.: Extrinsic modulation of human T-lymphocyte E rosette function associated with prolonged hepatocellular injury after viral hepatitis. J. Clin. Invest. 59, 134-142, 1977

Chisari, F.V.: Regulation of lymphocyte function by a soluble extract from normal human liver. J. Immunol. 121, 1279-1286, 1978

Chisari, F.V.: Immunoregulatory lipoproteins in viral hepatitis and cancer. In: Gotto, A.M., Smith, L.C., Allan, B. eds.: Atherosclerosis Vol. V., New York, Springer Verlag, 340-347, 1979

Chisari, F.V.: Regulation of lymphocyte function in viral transformation by hepatic bioregulatory molecules. Hepatology 2, 97-106, 1982

Cohen, S., Yoshida, T.: Lymphokine mediated reactions. In: Cohen, S., Ward, P.A., McCluskey, R.T. eds.: Mechanisms of immunopathology, New York - Chichester - Brisbane - Toronto, John Wiley and Sons, 49-68, 1979

Cohn, E.J., Strong, L.E., Hughes, W.L., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin, M., Taylor, H.L.: Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. J. Am. Chem. Soc. 68, 459-473, 1946

Cooperband, S.R., Davis, R.C., Schmid, K., Mannick, J.A.: Competitive blocking of lymphocyte stimmulation by serum immuno-

regulatory alpha-globulin (IRA). Transplant. Proc. 1, 516-524, 1969

Cooperband, S.R., Badger, A.M., Davis, R.C., Schmid, K., Mannick, A.J.: The effect of immunoregulatory alpha-globulin (IRA) upon lymphocytes in vitro. J. Immunol. 190, 154-163, 1972

Curtiss, L.K., Edgington, T.S.: Regulatory serum lipoprotein: Regulation of lymphocyte stimulation by a species of low density Lipoprotein. J. Immunol. 116, 1452-1458, 1976

David, J.R.: Delayed hypersensitivity in vitro: Its mediation by cell-free substance formed by lymphoid-cell-antigen interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 56, 73-77, 1966

Dawson, G.: Glycosphingolipid levels in an unusual neurovisceral storage disease characterized by lactocylceramid-galactosyl hydrolase deficiency: lactosylceramidosis. J. Lipid Res. 13, 207-219, 1972

Dinarello, C.A., Wolff, S.M.: Mechanism in the production of fever in humans. Sem. Infect. Dis. 6, 173-192, 1979

Economou, J.S., Shin, H.S.: Lymphocyte activation factor. I. Genaration and physiochemical charakterization. J. Immunol. 121, 1446-1452, 1978

Ellner, J.J.: Suppressor adherent cells in tuberculosis. J. Immunol. 121, 2573-2578, 1978

Epstein, L.B., Weil, J., Lucas, D.O., Cox, D.W., Epstein, C.J.: The biology and properties of interferon-gamma: An overview, studies of production by lymphocyte subsets, and analysis of peptide synthesis and antiviral effects in trisomy 21 and diploid human fibroblasts. In: De Maeyer, E., Galasso, G., Schellekens, H. eds.: The bilogy of the interferonsystem, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam - New York - Oxford, 247-256, 1981

Evans, R., Alexander, H.: Role of macrophages in tumor immunity. I. Cooperation between macrophages and lymphoid cells in syngenetic tumor immunity. Immunology 23, 615-626, 1972

Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.H.: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry 10, 2606-2617, 1971

Farrar, J.J., Mizel, S.B., Fuller-Farrar, J., Farrar, W.L., Hilfiker, M.L.: Macrophage-independent activation of helper T cells. I. Production of interleukin-2. J. Immunol. 125, 793-798, 1980

Farrar, J.J., Benjamin, W.R., Hilfiker, M.L., Howard, M., Farrar, W.L., Farrar-Fuller, J.: The biochemistry, biology, and role of interleukin-2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell. Immunological Rev. 63, 129-166, 1982

Garner, W.D., Farmer, J.L., Prager, M.D.: Human plasma-derived immunosuppressive factors having anti-lymphoma activity. Cancer Immunol. Immunother. 10, 7-16, 1980

Geubel, A.P., Keller, R.H., Summerskill, W.H.J., Dickson, E.R., Tomasi, T.S., Shorter, R.G.: Lymphocyte cytotoxity and inhibition studied with autologus liver cells: Observations in chronic active liver disease and primary cirrhosis syndrome. Gastroenterology 71, 450-456, 1976

Gianni, L., Di Padova, F., Zuin, M., Podda, M.: Bile acid-induced inhibition of the lymphoproliferative response to phytohemagglutinin and pockweed mitogen: An in vitro study. Gastroenterology 78, 231-235, 1980

Gillis, S., Ferm, M.M., Ou, W., Smith, K.A.: T cell growth factor: Parameters of production an a quantitative microassay for activity J. Immunol. 120, 2027-2032, 1978

Gillis, S., Mochizuki, D.Y., Canlon, P.J., Hefeneider, P.H., Banthum, C.A., Gillis, A.E., Frank, B.M., Henney, C.S.,

Watson, J.P.: Molecular characterization of interleukin-2. Immunological Rev. 63, 1982

Girman, G., Peese, H., Schwarze, G., Scheurlen, P.G.: Immunosuppression by micromolecular fibrinogen degradation products in cancer. Nature 259, 399-401, 1976

Glasgow, A.H., Nimberg, R.B., Menzoian, J.O., Saporoschetz, I., Cooperband, S.R., Schmid, K., Mannick, J.A.: Association of anergy with an immunosuppressive peptide fraction in the serum of patients with cancer. New Engl. J. Med. 291, 1263-1267, 1974

Gonzales, R., Verly, G.W.: Purification of an inhibitor of DNA synthesis in Mammary cells. Europ. J. Cancer 44, 689-697, 1978

Goodwin, J.S., Messner, R.P., Bankhurst, A.D., Peak, G.T., Saiki, J.H., Williams, R.C.: Prostaglandin producing suppressor cells in Hodgkin's disease. Clin. Immunol. Immunopathol.

Gordon, A.H.: The acute phase plasma proteins. In: Bianchi ed.: Plasma protein turnover, Univ. Park Press, Baltimore, 381-394,1978

Goren, R.G., Nelken, D.: Non-specific normal immunosuppressive protein (NIP): Purification and further biochemical characterization. Immunol. 49, 566-608, 1983

Grauer, W., Brattig, N.W., Schomerus, H., Frösner, G., Berg, P.A.: Immunosuppressive factors in viral hepatitis. III. Prognostic relevance of rosette inhibitory factor (RIF) and serum inhibitory factor (SIF) in accute and chronic hepatitis. Hepatology 4, 15-20, 1984

Green, K., Samuellson, B.: Prostaglandins and related factors. XIX. Thin layer chromatography of prostaglandins. J. Lipid Res. 5, 117-127, 1964

Grol, M., Schumacher, K.: Purification and biochemical characterization of a human liver derived inhibitory protein (LIP). J. Immunol. 130, 323-326, 1983

Hanna, N., Kalderon, R., Nelken, D.: Inhibition of T and B lymphocyte function by normal immunosuppressive protein. Immunology 29, 433-444, 1975

Hess, A.D., Gall, S.A., Dawson, J.R.: Inhibition of in vitro lymphocyte function by cyst and ascitic fluids from ovarian cancer patients. Cancer Res. 39, 2381-2389, 1979

Hess, A.D., Gall, S.A., Dawson, J.R.: Partial purification of a lymphocyte inhibitory factor(s) in ascitic fluids from ovarian cancer patients. Cancer Res. 40, 1842-1851, 1980

Hubbard, W.J.: Alpha$_2$-macroglobulin enzyme complexes as suppressors of cellular activity. Cell. Immunol. 39, 388-394, 1978

Hübner, L., Müller, G., Schimpl, A., Wecker, E.: Partial characterization and purification of T cell replacing factor (TRF). II. Biochemical characteristics. Immunochemistry 15, 33-38, 1978

Hübner, L., Kniep, E.M., Laukel, H., Sorg, C., Fischer, H., Gassel, W.D., Havemann, K., Kickhöfen, B., Lohmann-Matthes, M.-L., Schimpl, A., Wecker, E.: Chemical characterization of macrophage cytotoxity factor, macrophage migration inhibitory factor, T-helper cell-replacing factor, and colony stimulating factor from culture supernatants of concavalin A-stimulated murine spleen cells. Immunobiol. 157, 169-178, 1980

Izumi, T., Nagai, S., Suginoshita, T.: Serum immunosuppression test as a new tool for immunodiagnosis of lung cancer. Cancer Res. 40, 444-447, 1980

Kamo, I., Friedman, H.: Immunosuppression and the role of suppressive factors in cancer. Adv. Cancer Res. 25, 271-321, 1977

Kamrin, B.B.: Succesful skin homografts in nature non littermate rats treated with fractions containing alpha-globulins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100, 58-61, 1959

Kamo, I., Friedman, H.: Immunosuppression and the role of suppressive factors in cancer. Adv. Cancer Res. 25, 271-321, 1977

Kamrin, B.B.: Succesful skin homografts in nature non littermate rats treated with fractions containing alpha-globulins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100, 58-61, 1959

Kierszenbaum, F., Waksman, B.H.: Mechanism of action of lymphocyte activating factor (LAF). I. Association of lymphocyte activating factor action with early DNA synthesis in PHA-stimulated lymphocytes. Immunology 33, 663-669, 1977

Kniep, E.M., Domzig, W., Lohmann-Matthes, M.-L., Kickhöfen, B.: Partial purification and chemical characterization of macrophage cytotoxity factor (MCF, MAF) and its separation from macrophage migration inhibitory faxtor (MIF). J. Immunol. 127, 417-422, 1981

Koj, A.: Acute phase reactants. In: Allison, A.C. ed.: Structure and function of plasma proteins. Vol 1, Plenum Press, New York, 73-131, 1974

Kushner, I.: The acute phase reactants and the erythrocyte sedimentation rate. In Kelley, W., Ruddy, S., Sledge, C., Harris, E. eds.: Textbook of rheumatology, Saunders, Philadelphia, 669-676, 1980

Lämmli, U.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685, 1970

Lee, S.-C., Lucas, Z.J.: Properties of an inhibitor of DNA synthesis in supernatants of activated lymphocytes. Cell. Immunol. 39, 250-259, 1978

Leonhard, E.J., Rucco, L.P., Meltzer, M.S.: Characterization of macrophage activating factor, a factor that causes macrophages to become cytotoxic for tumor cells. Cell. Immunol. 41, 347-357, 1978

Levy, G.A., Chisari, F.V.: The immunopathogenesis of chronic HBV induced liver disease. Springer Semin. Immunopathol. 3, 439-459, 1981

Maisch, B., Berg, P.A., Kochsiek, K.: Autoantibodies and serum inhibition factor(s) (SIF) in patients with myocarditis. Klin. Wschr. 58, 219-225, 1980

Mangold, H.K.: Aliphatische Lipide. In: Stahl E. Hrsg.: Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 358-412, 1967

Marhaug, G., Husby, G.: Characterization of human amyloid related protein SAA as polymorphic protein: Association with albumin and prealbumin in serum. Clin. exp. Immunol. 45, 97-106, 1981

Marhaug, G., Sletten, K., Husby G.: Characterization of amyloid related protein SAA complexed with serum lipoproteins (apoSAA). Clin. exp. Immunol. 50, 382-389, 1982

Martini, A., Vitello, A.M., Siena, S., Capelli, V., Ugazio, A.G.: Multiple serum inhibitors of lectin-induced lymphocyte proliferation in nephrotic syndrome. Clin. exp. Immunol. 45, 178-184, 1981

Mella, B., Lang, D.J.: Leucocyte mitosis: Suppression in vitro associated with acute infectious hepatitis. Scince 155, 80-81, 1967

Metcalfe D.D., Kaliner, M.: The role of prostaglandins in allergic inflammation. In: Cellular functions in immunity and inflammation. Oppenheim et al. eds., Arnold, London, 356-380, 1981

Mizel, S.B., Oppenheim, J.J., Rosenstreich, D.L.: Characterization of lymphocyte activating factor (LAF) produced by a macrophage cell line P388D. II. Biochemical characterization of LAF induced by activated T cells and LPS. J. Immunol. 120, 1504-1508, 1978

Mizel, S.B.: Physiochemical characterization of lymphocyte activating factor (LAF). J. Immunol. 122, 2167-2172, 1979

Moghe, M.V., Advani, S.H., Gangal, S.G.: Demonstration of inhibitor factors affecting cell mediated immunity in patients with Hodgkin's disease. Europ. J. Cancer 16, 937-943, 1980

Moore, R.N., Oppenheim, J.J., Farrar, J.J., Carter, C.S., Waheed, A., Shadduck, R.K.: Production of lymphocyte activating factor (interleukin-1) by macrophages activated with colony-stimulating factors. J. Immunol.125, 1302-1305, 1980

Morse, J.H., Witte, L.D., Goodman, D.S.: Inhibition of lymphocyte proliferation stimulated by lectins and allogenic cells by normal plasma lipoproteins. J. Exp. Med. 146, 1791-1803, 1977

Mortensen, R.F.: C-reactive protein (CRP)-mediated inhibition of the induction of the in vitro antibody formation. Cell. Immunol. 44, 270-282, 1979

Mowbray, J.F.: Ability of large doses of an $alpha_2$-plasma-protein fraction to inhibit antibody production. Immunology 6, 217-225, 1963

Murray, E., Ruygrok, S., Milton G.W., Hersey, P.: Analysis of serum blocking factors against leucocyte dependent antibody in melanoma patients. Int. J. Cancer 21, 578-587, 1978

Nakao, M., Mizoguchi, Y., Monna, T., Yamamota, S., Morisawa, S.: Studies of the subpopulation and function of peripheral lymphocytes, and inhibitor to PHA stimulation existing in serum of patients with liver disease. Gastroenterologica Japonica 10, 307-315, 1975

Nakao, M., Mizoguchi, Y., Monna, T., Yamamota, S., Morisawa, S.: Studies of inhibitory factor to phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation found in serum of patients with various liver disease. Acta Hepato-Gastroenterol. 25, 335-343, 1978

Namba, Y., Waksman, B.H.: Regulatory substances produced by lymphocytes. I. Inhibitor of DNA synthesis in the rat. Inflammation 1, 5-14, 1975

Neher, R.: Dünnschichtchromatographie von Steroiden und verwandten Verbindungen. In: Dünnschichtchtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. Stahl, E. Hrsg., Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 302-349, 1967

Nelken, D.: Normal immunosuppressive protein (NIP). J. Immunol. 110, 1161-1162, 1973

Nelson, D.S., Penrose, J.M., Waters, M.F.R., Pearson, J.M.H., Nelson, M.: Depressive effect of serum from patients with leprosy to mixed lymphocyte reactions. Influence of anti-leprosy treatment. Clin. exp. Immunol. 22, 385-392, 1975

Nelson, D.S., Gatti, R.A.: Humoral factors influencing lymphocyte transformation. Prog. Allergy 21, 261-341, 1976

Newberry, W.M., Shorey, J.M., Sanford, J.P., Combes, B.: Depression of lymphocyte reactivity to phytohemagglutinin by serum of patients with liver diseases. Cell. Immunol. 6, 87-97, 1973

Newble, D.I., Holmes, K.T., Wangel, A.G., Forbes, I.J.: Immune reactions in viral hepatitis. Clin. exp. Immunol. 20, 17-28, 1975

Nimberg, R.B., Glasgow, A.H., Menzoian, J.A., Constantin, M.B., Cooperband, S.R., Mannick, J.A., Schmid, K.: Isolation of an immunosuppressive peptide fraction from serum of cancer patients. Cancer Res. 35, 1489-1495, 1975

Occhino, J.G., Glasgow, A.H., Cooperband, S.R., Mannick, J.A., Schmid, K.: Isolation of an immunosuppressive peptide fraction from human plasma. J. Immunol. 110, 685-694, 1973

Oh, S.K., Molten, F.L.: Nonspecific immunosuppressive factors in malignent ascites: Further characterization and possible relationship to erythrocyte receptors of human peripheral T cells. J. Immunol. 127, 2300-2307, 1981

Oppenheim J.J.: Lymphokines. In: Cellular functions in immunity and inflammation. Oppenheim et al. eds., Arnold, London, 259-282, 1981

Ottenson, E.A., Hiatt, R.A., Cheever, W.A., Sotomayor, Z.R., Neva, F.A.: The acquisation and loss of antigen-specific cellular immune responsivness in acute and chronic schistosomiasis in man. Clin. exp. Immunol. 33, 38-47, 1978

Papermaster, B.W., Gilliland, C.D., McEntire, J.E., Smith, E., Buchock, S.J.: Lymphokine mediated immunotherapy studies in mouse tumor systems. Cancer, 45, 1248-1253, 1980

Pappas, A., Phlippen, R., Pütz, T., Scheurlen, P.G.: Beeinträchtigung der zellulären Immunreaktion im Anfangsstadium der akuten infektiösen Hepatitis. Klin. Wschr. 48, 1362-1365, 1970

Passera, C., Pedrotti, A., Ferrari, G.: Thin layer chromatography of carboxylic acids and keto acids of biological interest. J. chromatog. 14, 289-291, 1964

Pierce, C.W., Knapp, D.D.: The role of macrophages in antibody response in vitro. In: Immunobiology of the macrophage. Nelson, D.S. ed., Academic Press, New York, 1-26, 1976

Pizzo, C., Lee, D., Chisari, F.V.: Suppression of lymphocyte activation by a protein released from isolated perfused rat liver. Hepatology 2, 10-18, 1982

Plow, E.F., Freaney, D., Edgington, T.S.: Inhibition of lymphocyte protein synthesis by fibrinogen-derived peptides. J. Immunol. 128, 1595-1599, 1982

Roberts, N.J., Sandberg, K.: Hyperthermia and human leucocyte function. II. Enhanced production of and response to leucocyte migration inhibition factor (LIF). J. Immunol. 122, 1990-1993, 1979

Robinson, D.R.: Low molecular weight mediators of inflammation: Prostaglandines and cyclic nucleotides. In: Textbook of Rheumatology, Kelley, W.N. et al. eds., Saunders, Philadelphia - London - Toronto, 62-71, 1981

Rocklin, R.E.: Partial characterization of leucocyte inhibitory factor by concavalin A-stimulated human lymphocytes. J. Immunol. 114, 1161-1165, 1975

Rocklin, R.E., Bendtzen, K., Greineder, D.: Mediators of immunity: Lymphokines and monokines. Adv. Immunol. 29, 55-136, 1980

Schimpl, A., Wecker, E.: Replacement of T cell function by a T cell product. Nature 237, 15-17, 1972

Schrempf-Decker, G.E., Baron, D.P., Brattig, N.W., Bockhorn, H., Berg, P.A.: Biological and immunological characterization of a human liver immunoregulatory protein (LIP).

Shainkin-Kestenbaum, R., Zimlichman, S., Winikoff, Y., Pras, M., Chaimovitz, C., Sarov, I.: Serum amyloid A (SAA) in viral infection: Rubella, measles, and subacute sclerosing panancephalitis (SSPE). Clin. exp. Immunol. 50, 503-506, 1982

Sipe, J.D., Vogel, S.N., Ryan, J.L., McAdam, K.W.J.P., Rosenstreich, L.D.: Detection of a mediator derived from endotoxin-stimulated macrophages that induces the acute phase response in mice. J. Exp. Med. 150, 597-606, 1979

Sipe, J.D., Rosenstreich, L.D.: Serum factors associated with inflammation. In: Cellular functions in immunity and inflammation. Oppenheim, J.J. et al. eds., Arnold, London, 411-429, 1981

Silver, H.K.B., Deneault, J., Gold, Ph., Thompson, W., Shuster, J., Freedman, S.O.: The detection of alpha-fetoprotein in patients with viral hepatitis. Cancer Res. 34, 244-247, 1974

Skogen, B. Sletten, K., Lea, T., Natvig, J.B.: Heterogenity of human amyloid protein A and its related serum protein , SAA. Scand. J. Immunol. 17, 83-88, 1983

Stahl E. Hrsg.:Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1967

Stanley, E.R.M., Heard, P.M, Defendy, V.: Factors regulating macrophage production and growth: Identity of colony stimulating factor and macrophage growth factor. J. Exp. Med. 143, 631-647, 1976

Tadakuma, T., Kühner, A.L., Rich, R.R., David, J.R., Pierce, C.W.: Biological expression of lymphocyte activation. V. Characterization of a soluble immune response suppressor (SIRS) produced by concanavalin A-activated spleen cells. J. Immunol. 117, 323-330, 1976

Thomas, H.C., Potter, B.J., Jain, S., Hodgon, H., Sherlock, S.: C1q binding, anti-complementary activity and immunoconglutinins in acute and chronic liver disease. In: 12 th Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Karger, Hrsg., Basel, Nr. 259, Abstr.

Ting, C.C., Tsai, S.C., Rogers, M.J.: Host control of tumor growth. Science 197, 571-573, 1977

Togawa, A., Oppenheim, J.J., Mizel,S.B.: Characterization of lymphocyte activating factor (LAF) produced by human mononuclear cells: Biochemical relationship of high and low molecular weight forms of LAF. J. Immunol. 122, 2112-2118, 1979

Tomasi, T.B.: Structure and function of alpha-fetoprotein. Ann. Rev. Med. 28, 453-465, 1977

Tomasi, T.B.: Suppressive factors in amniotic and newborn serum: Is alpha-fetoprotein involved ? Cell. Immunol. 37, 459-466, 1978

Toy, J.L.: The interferons. Clin. exp. Immunol. 54, 1-13, 1983

Tremolada, F., Fattovich, M., Angi, L., Realdi, R.: Lymphocyte function and serum factors in AB_sAG-positive acute Hepatitis (AH) and chronic active hepatitis (CAH) and in healthy carriers (CHC). In: 12 th Meeting of the European Association for the study of the liver (EASL). Karger, Hrsg., Basel, 1977, Nr. 261, Abstr.

Voorting-Hawking, M., Michael, J.G.: Isolation and characterization of immunoregulatory factors from normal human serum. J. Immunol. 118, 505-513, 1977

Wagner, H., Hörhammer, L., Wolff, P.: Dünnschichtchromatographie von Phosphatiden und Glycolipiden. Biochem. Z. 334, 175-185, 1960

Watson, J., Aarden, L.A., Lefkovitz, I.: The purification and quantification of helper T cell-replacing factors secreted by murine spleen cells activated with concavalin A: J. Immunol. 122, 209-215, 1978

Watson, J., Mochizuki, D., Gillis, S.: T-cell growth factors: Interleukin-2. Immunolgy Today, 1, 113-118, 1980

Willems, F.T.C., Melnickl, J.L., Rawls, W.E.: Viral inhibition of the PHA-response of human lymphocytes and application to the viral hapatitis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130, 652-661, 1969

Wolf, R.L., Merler, E.: Role of lipids in the immune response. I. Localization to a lipid-containing fraction of the active moiety of an inhibitor (SIF) of lymphocyte proliferation. J. Immunol. 123, 1169-1174, 1979

Wolf, R.L., Andreoni, J.: Soluble inhibitory factor (SIF) in normal human serum. Cell. Immunol. 67, 299-311, 1982

VII. A N H A N G

Anhang zu Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3, Abb. 4, Abb. 5, Abb. 8, Abb. 9, Abb. 14

In den Tabellen des Anhangs werden die Ergebnisse der einzelnen Serumfraktionierungen, aus denen die Mittelwerte der Abbildungen gemittelt wurden, aufgelistet.

Tabelle 7: DEAE-Ionenaustauschchromatographie SIF-positiver und SIF-negativer Seren mit NaCl-Stufengradienten in Phosphatpuffer bei pH 8

SIF^+	65 mM	125 mM	175 mM	200 mM	250 mM	500 mM
1	10	12	66	68	53	11
2	12	31	70	63	17	25
3	14	16	50	28	29	12
4	0	14	72	63	22	11
5	23	10	51	32	8	0
6	8	12	69	58	47	17
7	9	0	62	53	37	14
8	0	21	62	25	33	0
9	24	29	87	83	64	13
10	23	40	66	60	29	22
$\bar{x}$	12	19	65	53	34	13
s	9	12	10	19	17	8
SIF^-	65 mM	125 mM	175 mM	200 mM	250 mM	500 mM
1	11	0	45	32	21	10
2	15	0	50	35	12	18
3	0	13	61	36	8	28
4	0	18	48	35	11	0
5	11	9	32	21	15	29
6	19	19	48	36	9	0
7	16	31	37	10	8	14
$\bar{x}$	15	13	46	29	12	14
s	7	11	9	10	5	12

Tabelle 8: Gelfiltration SIF-positiver und SIF-negativer Seren an Sephadex G-150

SIF^+	Fraktion I	Fraktion II	Fraktion III
1	29	17	60
2	32	17	49
3	17	27	52
4	16	6	62
5	30	30	57
6	31	27	53
7	24	26	58
$\bar{x}$	25	21	56
s	7	9	5

SIF^-	Fraktion I	Fraktion II	Fraktion III
1	29	22	38
2	21	14	27
3	18	19	36
4	16	22	42
5	30	25	32
$\bar{x}$	22	20	35
s	6	4	6

Tabelle 9: DEAE-Ionenaustauschchromatographie von Fraktion III (G-150) SIF-positiver und SIF-negativer Seren mit NaCl-Stufengradienten bei pH 8

SIF^+	65 mM	125 mM	175 mM	200 mM	250 mM	500 mM
1	19	17	63	26	12	2
2	27	18	54	41	8	14
3	23	8	64	36	29	19
4	21	24	68	37	14	9
$\bar{x}$	23	8	62	35	16	11
s	3	7	6	6	9	7
SIF^-	65 mM	125 mM	175 mM	200 mM	250 mM	500 mM
1	18	24	31	22	11	10
2	21	21	45	18	21	13
3	23	19	19	16	23	17
4	23	23	38	19	19	13
$\bar{x}$	21	22	38	19	19	13
s	2	2	8	3	5	3

Tabelle 10: Gelfiltration der aktiven DEAE-Fraktionen III und IV SIF-positiver Seren an Sephadex G-100

F III (DEAE)	F I (G-100)	F II (G-100)
1	21	59
2	9	47
3	12	58
4	17	54
$\bar{x}$	15	55
s	5	5
F IV (DEAE)	F I (G-100)	F II (G-100)
1	27	36
2	34	49
3	37	43
4	30	48
$\bar{x}$	32	44
s	4	6

Tabelle 11: Affinitätschromatographie SIF-positiver und SIF-negativer Seren an Cibacron Blue Affinity Gel mit als erstem Fließmittel und 2 M NaCl als Elutionsmittel für Albumin

	Durchlauf		Eluat	
SIF^+	20 µg	40 µg	20 µg	40 µg
1	21	26	3E	58
2	32	36	38	59
3	0	1	55	77
4	4	10	51	68
5	21	18	68	91
6	24	18	64	89
7	25	30	53	61
8	26	36	36	57
9	23	26	57	74
10	16	19	53	73
11	20	37	36	60
12	19	23	42	61
$\bar{x}$	19	23	49	69
s	9	11	11	12
SIF^-	20 µg	40 µg	20 µg	40 µg
1	22	30	25	27
2	2	4	8	38
3	20	27	28	38
4	13	8	31	39
5	12	12	29	34
6	20	24	30	41
7	0	22	30	39
8	17	16	28	38
$\bar{x}$	14	18	26	37
s	9	9	8	4

Tabelle 12: Gelfiltration von Eluaten SIF-positiver und SIF-negativer Seren an Sephadex G-75 in 5 M NaCl

SIF^+	Eluat	Fraktion I	Fraktion II
1	60	69	65
2	48	48	39
3	78	65	60
4	77	59	38
5	74	63	47
$\bar{x}$	67	61	50
s	13	8	12
SIF^-	Eluat	Fraktion I	Fraktion II
1	38	25	29
2	27	28	29
3	46	49	33
4	41	40	31
$\bar{x}$	38	35	31
s	8	11	2

SIF^+	Eluat	F I	F IIa	F IIb	F IIc	F IId
1	68	62	64	60	57	37
2	74	63	53	57	56	49
3	60	56	48	61	39	24
$\bar{x}$	67	60	55	59	50	36
s	6	4	8	2	10	13

Tabelle 13: Molekularfiltration von Eluaten SIF-positiver und SIF-negativer Seren über Filter der Trengrenze 10000 d in 5 M NaCl

SIF$^+$	Eluat	org. Phase	wässr. Phase
1	60	62	57
2	60	63	55
3	80	63	60
4	50	53	55
5	74	57	50
$\bar{x}$	71	59	57
s	11	4	8
SIF$^-$	Filtrat	org. Phase	wässr. Phase
1	90	73	46
2	68	63	44
3	71	55	39
4	60	59	51
$\bar{x}$	74	63	45
s	10	8	5

Tabelle 14: Extraktion von Eluaten und Filtraten SIF-positiver Seren in Chloroform/Methanol (1/1)

SIF$^+$	Eluat	> 10000 d	< 10000 d
1	60	28	90
2	50	25	68
3	77	33	97
4	60	25	70
5	78	32	71
6	74	29	69
$\bar{x}$	69	29	79
s	9	3	11
SIF$^-$	Eluat	> 10000 d	< 10000 d
1	37	26	46
2	36	17	46
3	35	25	34
$\bar{x}$	36	23	40
s	1	5	6

Lebenslauf

Christoph Bröckl,

geboren am 10. Februar 1952 in Freiburg/Brsg.

April 1959 - April 1963	Grundschule in Radolfzell
April 1963 - November 1965	St. Michaelsgymnasium, Schwäb. Hall
November 1965 - Juni 1971	Kreisgymnasium in Titisee-Neustadt
21. Juni 1971	Reifeprüfung
Juli 1971 - September 1972	Wehrdienst in Weiden/Obpf.
ab Oktober 1972	Studium der Biologie an der Universität Tübingen
6. März 1981	Diplomprüfung in Biologie

Anschließend Anfertigung der Dissertation: "Zur Charakterisierung eines immunsuppressiven Serumfaktors bei der akuten und chronischen Hepatitis" an der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. P.A. Berg.

Akademische Lehrer:

D. Ammermann, P.A. Berg, W. Bessler, V. Braun, K.G. Grell, K. Hantke, V. Hemleben, D. Mecke, P. Möhres, W. Seyffert, P. Wenk, S. Winkler, K. Wöhrmann, A. Wörz, H. Zähner

Druck und Verarbeitung: Dissertations Druck Darmstadt, Tel. 0 61 51 / 21 3 53